





Mikromethodik

Quantitative Bestimmung der Harn- und Blutbestandteile in kleinen Mengen

für

klinische und experimentelle Zwecke

von

Ludwig Pincussen

Direktor der biochemischen Abteilung
des Städt. Krankenhauses am Urban in Berlin

Dritte, vermehrte und verbesserte Auflage

Mit 26 Abbildungen





Leipzig 1925
Verlag von Georg Thieme

Roßberg'sche Buchdruckerei, Leipzig

Vorwort.

Besonders für klinische Zwecke im weitesten Sinne, aber auch für die Ziele der experimentellen Pathologie erweist es sich als immer wichtiger, chemische Bestimmungen mit möglichst kleinen Substanzmengen auszuführen. Ganz abgesehen davon, daß es infolge der Teuerung, besonders auch der wissenschaftlichen Apparate und Chemikalien dringend nötig ist, sich in allem auf das notwendigste Maß zu beschränken, sind die Mikrobestimmungen auch darum von größter Wichtigkeit, weil sie uns erlauben, besonders im Blute Bestimmungen auszuführen, die unter anderen Verhältnissen unmöglich wären. Wo man früher einen Aderlaß von 100 ccm und mehr brauchte, kommt man heute mit dem Inhalt einer kleinen Spritze, in einzelnen Fällen mit einigen Tropfen Blut, die man aus der Fingerbeere entnimmt, aus. Hierdurch ist es möglich geworden, daß man sogar in kurzen Intervallen quantitative Reihenuntersuchungen anstellen kann.

Die Menge des zu einer Mikrobestimmung notwendigen Materials ist abhängig von der Leistungsfähigkeit der Methode. Während einzelne Verfahren mit einigen Tropfen Blut durchaus genaue Resultate geben, sind für andere immerhin 2—5 ccm erforderlich. Nur solche Mikrobestimmungen haben Wert, deren Ergebnisse denen der üblichen Makrobestimmungen durchaus gleichwertig sind: eine Reduktion des Materials, welche man mit ungewissen Resultaten erkauft, ist absolut unzulässig. Nur die genauesten Ergebnisse haben für die klinische und experimentell-pathologische Forschung Interesse.

Dieses kleine Büchlein macht keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Es enthält die mir bekannten „Mikromethoden“, welche sich mir in mehrjähriger Anwendung im klinisch-chemischen Laboratorium bewährt haben und die ich in meinen Kursen lehre. Sie sind mit den Mitteln eines klinisch-chemischen Laboratoriums ohne weiteres auszuführen: besonders schwierige Apparaturen habe ich vermieden. Ich habe teils Methoden von anderen über-

nommen, häufig diese modifiziert, teils sie selbst ausgearbeitet. Auf große Auswahl der Methoden habe ich keinen Wert gelegt; mein Ziel war, ein praktisches Büchlein zu schaffen, und dem einigermaßen Vorgebildeten für jeden bisher möglichen Zweck eine, höchstens zwei brauchbare Methoden so darzustellen, daß ein direktes Arbeiten danach ohne Schwierigkeit möglich ist.

Den Fachgenossen wäre ich für Anregungen, den Kreis der Untersuchungen auf noch andere Stoffe auszudehnen, zu Dank verpflichtet. Für manche Bestimmungen existieren Mikromethoden bisher nicht. Ich hoffe, daß es mir später möglich sein wird, neue Methoden zuzufügen und der Vollständigkeit, die ich jetzt nicht erreichen kann, näher zu kommen.

Berlin, im Juni 1921.

Pincussen.

Vorwort zur 3. Auflage.

In weit höherem Maße, als es in der zweiten Auflage der Fall war, habe ich bei dieser Ergänzungen anbringen können, welche, wie ich hoffe, die Brauchbarkeit des Büchleins erhöhen werden. Eine ganze Anzahl von Methoden sind neu dazugekommen, meist solche, die ich selbst ausgearbeitet habe und die anderweitig noch nicht veröffentlicht sind. Von Methoden anderer Autoren nenne ich die Bestimmung des Aminostickstoffs nach Folin, die des Blutzuckers nach Hagedorn und Jensen, die des Natriums und Magnesiums im Blute aus dem Spiroschen Institut, die sehr zweckmäßige Vereinfachung der Barcroftschen Gasanalyse nach Verzár.

Es scheint mir, daß neuerdings die Analyse des Harns gegenüber der des Blutes stark vernachlässigt wird, obgleich hier noch sehr viele wichtige Probleme der Aufklärung harren. Ich habe aus diesem Grunde eine Reihe von Mikromethoden zur Bestimmung der anorganischen Harnkomponenten aufgenommen und hoffe damit manchem einen Dienst erwiesen zu haben.

Berlin, im März 1925.

Pincussen.

Inhalt.

Allgemeine Regeln.

Für mikrochemische Arbeiten gelten im allgemeinen dieselben Regeln wie für chemisches Arbeiten überhaupt. Bei den geringen Substanzmengen, welche für die Ausführung quantitativer Mikroanalysen — nur solche werden in den nachfolgenden Blättern beschrieben —, angewandt werden, kommt es ganz besonders auf exaktes Arbeiten an. Es ist klar, daß bei Analysen mit kleinen Mengen die Fehlerquellen eine ganz andere Rolle spielen müssen als bei Verwendung größerer Quantitäten. Diese Fehlerquellen nach Möglichkeit zu reduzieren, ist eine Hauptaufgabe des mikrochemischen Arbeiters.

Fehler können, ohne daß den Arbeiter eine Schuld dabei trifft, schon verursacht sein durch ungeeignete Apparatur sowie durch die angewandten Reagentien. Über spezielle, für mikrochemische Analytik erforderliche Apparate wird unten ausführlich gesprochen werden. Hier möge vor allem darauf aufmerksam gemacht sein, daß gewöhnliches Natronglas nur für kalte Flüssigkeiten benutzt werden soll, daß zum Kochen aber ausschließlich Jenaer Glas, das für bestimmte Zwecke noch besser durch Quarz zu ersetzen ist, angewendet wird. Mitunter kann Kork, öfter Kautschuk, besonders alter, sowohl bei Anwendung als Stopfen als auch von Schläuchen zu Fehlern Anlaß geben. Reinere Resultate erhält man sicher bei Anwendung nur gläserner Verbindungen und Apparaturen. Bei Vereinigung zweier Rohre durch Kautschukschlauch achte man auf ein Zusammenstoßen dieser: Glas an Glas. Zum Filtrieren werden vielfach mit Vorteil statt der gewöhnlichen Filter die Jenaer Filtergeräte (Schott & Gen) mit eingeschmolzener Filterplatte verwendet, die trotz des ziemlich hohen Preises infolge ihrer bequemen Handhabung, guten und exakten Arbeitens und langer Verwendbarkeit mannigfache Vor-

teile bieten. Die Ausmessungen sämtlicher für die Mikromethodik bestimmten Apparate sollen so klein sein, wie es sich mit dem bestimmten Zwecke vereinigen läßt, um nicht das Arbeiten mit den möglichst geringen Substanzmengen zu erschweren. Von Reagentien sind stets die allerreinsten erhältlichen zu wählen, wie die reinsten Merckschen Reagentien und die Präparate von Kahlbaum pro analysi. Auch diese reinsten Reagentien enthalten häufig Beimengungen, die geeignet sind, die erhaltenen Resultate zu fälschen. So gibt es beispielsweise im Handel keine Schwefelsäure, die absolut ammoniakfrei wäre. In solchen Fällen ist es nicht zweckmäßig, eine noch weitere Reinigung anzustreben: man arbeitet mit den nicht ganz reinen Reagentien, bestimmt aber vor der Ingebrauchnahme die Größe des betreffenden Fehlers, welcher dann in alle Berechnungen eingesetzt wird. Solche Bestimmungen sind jedesmal zu wiederholen, wenn man eine neue Packung der Substanz anbricht. Während des Gebrauches ist dafür Sorge zu tragen, daß eine Veränderung nicht eintritt. Die für die Mikromethodik bestimmten Reagentien sind demnach in gut verschlossenen Flaschen aufzuheben: unter besonderen Umständen kann man das Eindringen schädigender Substanzen durch besondere Maßnahmen hintenanhalten: beispielsweise die Flasche mit der für die Mikrokjeldahlmethodik bestimmten Schwefelsäure mit einem Verschluß in der Art einer mit Schwefelsäure gefüllten Gaswaschflasche zur Zurückhaltung des Ammoniaks versehen. Den Räumen, in welchen Analysen ausgeführt werden, sind solche Dämpfe und Gase, welche die Reaktion beeinflussen können, selbstverständlich fernzuhalten; die Ausführung einer Mikrokjeldahldestillation in einem Raum mit Ammoniakdämpfen führt naturgemäß zu den schwersten Fehlern.

Von allgemeinen gebrauchten Apparaten ist zunächst eine Luftpumpe zu erwähnen, die sowohl bei der Destillation wie auch beim Absaugen schädlicher Dämpfe (S. 45) gebraucht wird. Für die in Frage kommenden Zwecke eignet sich am besten die einfache Wasserstrahlpumpe, die an jede Leitung mit nicht zu geringem Druck an-

geschlossen werden kann. Für viele Verfahren ist das Vorhandensein einer Zentrifuge sehr erwünscht. Je größer ihre Umdrehungszahl, desto schneller das Arbeiten; es kommen daher nur mechanisch betriebene (elektrisch oder Wasser) Zentrifugen in Betracht. Es sei auf das sehr genaue Auswiegen der Zentrifugenbecher mit Inhalt hingewiesen: nur wenn die gegenüberliegenden Behälter im Gewichte vollständig gleich sind, kann die Abschleuderung in erwünschter scharfer Weise erfolgen. Es sind daher stets vor jedem Zentrifugieren die Becher mit Inhalt gegeneinander auszutarieren. Für manche Bestimmungen, besonders die des Natriums, müssen die Zentrifugengläser aus Jenaer Glas hergestellt sein; auch da, wo die Zentrifugengläser mit Inhalt größerer Erhitzung ausgesetzt werden (vgl. z. B. S. 77), ist dieses Material zu wählen.

Messen und Wägen.

Besondere Aufmerksamkeit erfordert das Messen und Wägen. Bei den biochemischen Untersuchungsmethoden, die hier geschildert werden, ist eine Mikrowage im eigentlichen Sinne nicht erforderlich. Sämtliche Wägungen, die hier in Betracht kommen, können mit einer empfindlichen chemischen Analysenwage ausgeführt werden. Bei Herstellung von Reagentienlösungen, insbesondere bei der Bereitung von Testlösungen sind, um die Wägefehler möglichst zu reduzieren, als Ausgangsmaterial nicht zu kleine Quantitäten zu wählen und die erforderliche Konzentration lieber durch Verdünnung herzustellen. Für das System der Mikroanalyse des Blutes nach Bang genügt im Notfalle ebenfalls jede Analysenwage; es ist jedoch dann erforderlich, daß die notwendigen Gewichte sofort zur Hand sind, da diese Wägungen außerordentlich schnell ausgeführt werden müssen. Diese Notwendigkeit der sehr schnellen Wägung, die dadurch bedingt ist, daß das in kleinen Löschpapierblättchen aufgesaugte Blut durch Wasserverdunstung sehr bald an Gewicht verliert, hat zur Anwendung von sehr schnell arbeitenden Torsionswagen geführt.

Von diesen haben sich besonders gut die von Hartmann und Braun (Frankfurt a. M.) für verschiedene Meßbereiche konstruierten bewährt (s. Abb. 1). Bei dem gewöhnlichen und für die meisten Zwecke geeigneten Modell beträgt der Meßbereich der Skala 1 g, der in Unterabteilungen von 2 mg eingeteilt ist, so daß eine Ablesung von 1 mg noch möglich ist. Andere Einteilungen, die ein geringeres Meßbereich mit dementsprechenden kleineren Intervallen umfassen, sind für die gewöhnlichen Zwecke der biologischen Mikromethodik unnötig, da eine Wägung auf 1 mg Genauigkeit genügt. Die Einstellung der Wage wird zuerst durch die Stellschraube des Fußes so vorgenommen, daß das Lot senkrecht hängt. Seitlich ragt ein kleiner Hebel (Wagebalken) a heraus, der mit einem Häkchen armiert ist. Im allgemeinen wird die Wage mit dem Häkchen zusammen so ausbalanciert sein, daß bei dieser Belastung die Wage gerade auf dem Nullpunkt steht (Ablesung siehe unten). Es spielt jedoch keine Rolle, wenn dies nicht der Fall ist: dann ist bei absoluten Wägungen vorher der Nullpunkt zu bestimmen, bei relativen Wägungen, wie sie zur Bangschen Methodik ausschließlich angewandt werden, ist auch dies nicht erforderlich. Bei der Bangschen Methodik handelt es sich darum, daß man Löschpapierstückchen bestimmter Größe zunächst leer und dann nach Einsaugung einiger Bluttröpfchen wiegt. Damit man die Plättchen an dem Häkchen des Wagebalkens aufhängen kann, durchlocht man sie an der einen Schmalseite mit einem scharfen Locher, am ein-

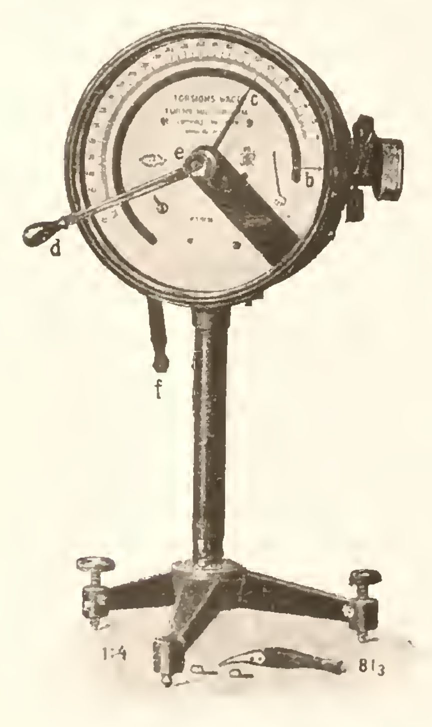


Abb. 1.

fachsten mit der einen Lochstanze eines für die Lochung von Briefen üblichen Apparates. Es ist wichtig, daß das Loch scharf ausgestanzt ist. Man hängt nun an diesem Loch das Plättchen auf, löst die Arretierung der Wage, indem man den Hebel f zur Mitte hin drückt und bewegt den Hebel d so lange, bis der Zeiger b genau auf der Nullinie steht: um parallaktische Verschiebungen zu vermeiden, ist hinter der ganzen Skala ein Spiegel angebracht. Man visiert von vorn und sorgt dafür, daß die Schneide b mit der Nullinie und dem Spiegelbild scharf zusammenfällt. Der Zeiger c gibt dann sofort das Gewicht an. Auch hier muß genau visiert werden, so daß sich Zeiger und Spiegelbild decken. Nach Feststellung des Gewichtes wird zunächst die Wage durch Umlegen des Arretierhebels f festgestellt und erst dann das Blättchen vom Wagebalken abgenommen. Die Wägung des mit Blut beschickten Blättchens erfolgt in ganz gleicher Weise: bei einiger Übung ist eine Wägung ohne Schwierigkeit in einigen Sekunden auszuführen.

Die Wage läßt sich auch für andere Wägungen kleiner Substanzmengen benutzen. Handelt es sich um solche Körper, die man nicht einfach wie Papierblättchen anhängen kann, so können kleine Schälchen oder Tiegelchen benutzt werden, welche an den Haken angehängt werden, und in welche die zu wiegende Substanz hineingetan wird. Über Ersatz der Wägung durch Messung s. S. 66.

Abb. 2.

Besondere Wichtigkeit kommt den messenden Methoden zu. Es gelten hier im wesentlichen die gleichen Vorschriften wie bei den Makrobestimmungsmethoden; es ist auf größte Genauigkeit der Meßgefäße Gewicht zu legen. Die verwendeten Pipetten prüfe man vorher genau, wenn nötig durch Auskalibrieren mit Quecksilber;

vor allem verwende man für die gleichen Zwecke stets die gleichen Pipetten, stelle insbesondere fest, ob die Pipetten auf Abstreichen oder auf Ausblasen geeicht sind und vergesse nie, dieselbe Pipette stets in der gleichen Weise zu verwenden. Wenn irgend möglich, arbeite man nur mit Vollpipetten, die meist allein genügende Genauigkeit gewährleisten. Wenn anomale Maße gebraucht werden (z. B. bei der Bang'schen Zuckerbestimmung Pipetten von 6,5 ccm Inhalt), so lasse man sie besonders anfertigen. Das gleiche wie für die Pipetten gilt für die Büretten. Für manche Zwecke der Mikroanalyse genügen gewöhnliche, in $^1/_{20}$ ccm geteilte Büretten; für spezielle Zwecke sind Mikrobüretten erforderlich, die in $^1/_{100}$ ccm eingeteilt sind. Während bei den gewöhnlichen Büretten unter Umständen ein Klemmverschluß genügt, müssen diese Mikrobüretten unbedingt mit einem Glashahn versehen sein. Die Tropfengröße muß eine so geringe sein, daß ein Tropfen ungefähr 2 Teilstrichen der Bürette entspricht. Da eine Füllung dieser Apparate, die naturgemäß ein sehr enges Rohr haben, in direkter Weise mit Schwierigkeit verknüpft ist, sind diese Büretten so konstruiert, daß ein am unteren Teil abgehendes kommunizierendes Rohr, das durch einen Glashahn gegen die Bürette abgeschlossen werden kann, an seinem oberen Ende in einem Vorratsgefäß endigt, welches imstande ist, so viel Flüssigkeit aufzunehmen, daß man die Bürette daraus 8—10 mal auffüllen kann (s. Abb. 2). Das Rohr sei nicht zu eng, ebenso sei der Hals des Reservoirs weit genug, um die Lösung bequem eingießen zu können, ohne daß sich schwer entfernbare Luftblasen zwischen die Flüssigkeit setzen. Über die Ausführung der Maßanalyse wird bei der Beschreibung der speziellen Methoden gesprochen werden.

Auf die Herstellung der Maßflüssigkeiten ist größte Sorgfalt zu verwenden. Besonders ist zu beachten, daß eine große Zahl von Titrierlösungen, besonders sehr geringer Konzentration, sich schlecht hält und bald ihren Titer ändert. Das gilt in erster Linie von der Jodlösung und der Natriumthiosulfatlösung, die

jedesmal frisch aus höher konzentrierten Lösungen, die selbstverständlich auch nachkontrolliert werden müssen, zu bereiten sind. Man hält sich zweckmäßig $^1/_{10}$ Normallösungen, die man entweder fertig bezieht oder selbst nach den Regeln der Maßanalyse herstellt, und bereitet aus ihnen die für den betreffenden Tag erforderlichen Mengen der gebrauchten Lösung. Wo der Transport fertiger Lösungen schwierig und teuer ist, kann man auch von fabrikmäßig hergestellten, in Ampullen eingeschmolzenen Salzen bzw. konzentrierten Lösungen ausgehen (Fixanal oder ähnliche Präparate), die nach Anweisung aufgelöst, ohne Wägung u. dgl. $^1/_{10}$ Normallösungen ergeben. Zur Herstellung einer $^1/_{100}$ Normalthiosulfatlösung pipettiert man in ein genaues 50 ccm Meßkölbchen mit Glasstopfen mit einer genauen Pipette 5 ccm der $^1/_{10}$ Normalthiosulfatlösung, füllt mit destilliertem Wasser von 15^0 bis zur Marke auf und mischt nach Aufsetzen des Stopfens gut durch. Zweckmäßig ist es stets, die so hergestellten schwachen Lösungen auf ihre Richtigkeit mit bekannten Lösungen zu vergleichen. Lösungen von Säuren, Laugen, auch von Silbernitrat, wenn in dunkler Flasche gegen Licht geschützt aufbewahrt, halten sich auch in geringen Konzentrationen.

Am besten verwendet man ganz trockene Pipetten bzw. Büretten. Noch etwas feuchte sind mit der betreffenden Lösung, die man mit ihnen abmessen will, wiederholt so durchzuspülen, daß man bei Pipetten etwas der Lösung in ein sauberes trockenes Reagensglas einfüllt, die Lösung in die Pipette hochzieht, durchspült und auslaufen läßt. In ein anderes trockenes Reagensglas gibt man wieder etwas frische Lösung und verfährt ebenso und wiederholt diese Prodezur am besten noch ein drittes Mal. Bei Büretten verfährt man sinngemäß. Die zum Ausspülen benutzten Lösungen sind natürlich fortzugießen. Man hüte sich insbesondere, mit Pipetten in Originalflaschen mit Normallösungen hereinzugehen, da hierdurch die Konzentration beeinflußt und die Lösung für genaue Versuche unverwendbar wird.

Kolorimetrische Methoden.

Besondere Wichtigkeit haben für die Mikrobestimmungen die kolorimetrischen Methoden erlangt. Ich empfehle sie jedoch nur in solchen Fällen, in denen es mit den maßanalytischen Methoden nicht gelingt, genügend scharfe Ausschläge zu erhalten. In allen Fällen, wo die sehr empfindliche Maßanalyse, besonders die jodometrische Bestimmung, scharfe Umschläge ergibt, ist diese der kolorimetrischen Bestimmungsmethode vorzuziehen, vor allem deshalb, weil sie frei von subjektiven Fehlern ist, und ohne Schaden für die Genauigkeit z. B. die laufenden Bestimmungen einer Versuchsreihe auch von verschiedenen gut eingearbeiteten Personen ohne weiteres ausgeführt werden können.

Bei der kolorimetrischen Methode zeigen sich für die Augen verschiedener Personen deutliche Differenzen, da der Begriff gleicher Farbenintensität, auf den es bei der Kolorimetrie ankommt, individuell verschieden ist. Demnach wird die Titration von mehreren Personen ohne weiteres ganz gleichmäßig ausgeführt: bei der kolorimetrischen Bestimmung dagegen zeigen verschiedene Individuen typische Differenzen der Ablesung, die zwar immer konstant bleiben und die Resultate durchaus einwandfrei erscheinen lassen, wenn die Ablesung immer von derselben Person erfolgt, bei Wechsel des Beobachters aber zu erheblichen Fehlern führen können.

Sämtliche Kolorimeter bestimmen die Konzentration einer gefärbten Lösung mit Hilfe der bekannten Konzentration einer gleichgefärbten Lösung aus dem Verhältnis der Schichtdicken dieser beiden Lösungen, wenn beide dem beobachtenden Auge gleich hell erscheinen. Es besteht für diesen Fall das einfache Gesetz, daß die Schichtdicken umgekehrt proportional den Konzentrationen sind: ist c die Konzentration der zu bestimmenden Lösung, c_1 die Konzentration einer Lösung bekannten Gehaltes und sind s und s_1 die Schichtdicken der Lösungen, wenn die Farbtiefen beider dem Auge gleich erscheinen, so gilt das Verhältnis

$$c : c_1 = s_1 : s.$$

Bekannt sind in dieser Proportion die beiden Schichtdicken, die man an jedem Kolorimeter durch eine entsprechende Vorrichtung ermitteln kann und die Konzentration der bekannten Vergleichslösung, so daß wir mit Hilfe der kolorimetrischen Ablesung

$$c = \frac{c_1 \cdot s_1}{s}$$

bestimmen können.

Das einfachste der für die Mikroanalyse brauchbaren Kolorimeter ist das nach Dubosq, das in verschiedenen, z. T. vorzüglichen Ausführungen verwendet wird und das auch als einfachstes in der Konstruktion im Prinzip beschrieben werden soll (s. Abb. 3). In zwei Glaströge T und T_1, die unten einen glatten, gläsernen Boden haben, werden die zu vergleichenden gefärbten Flüssigkeiten eingefüllt. Durch mehr oder weniger tiefes Eintauchen von Glasprismen kann man die Schichtdicke, durch eine Skala kontrolliert, variieren. Durch ein optisches M wird das Licht durch die Tröge T und T_1 in die Prismen P und P_1 geworfen, von denen es durch ein Linsensystem in das Auge gelangt — ist es möglich, die Färbungen der beiden Tröge nebeneinander als Hälften eines Kreises zu beobachten. Nachdem man die Kontrollösung auf eine gewisse Schichtdicke, z. B. 40 mm eingestellt hat, variiert man durch mehr oder minder tiefes Eintauchen des anderen Prismas die Schichtdicke der Versuchsflüssigkeit so lange, bis dem Auge die beiden Hälften des Kreises gleich stark gefärbt erscheinen. Man darf sich mit einer Ablesung nicht begnügen, sondern muß eine ganze Anzahl machen, deren Mittel man dann nimmt. Zweckmäßig ist es hierbei, das eine Mal von geringerer zu höherer Färbung, das andere Mal von höherer zu geringerer Färbung vorzugehen. Die Berechnung ergibt sich aus dem oben Gesagten.

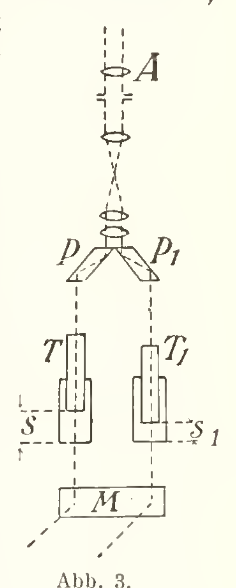


Abb. 3.

Von den vielen Kolorimeterkonstruktionen sei, als für alle Zwecke geeignet, noch das Chromophotometer von Plesch genannt. Bei diesem Apparat ist die optische Einrichtung dadurch verändert, daß ein Lummer-Brodhunscher Würfel verwandt ist, so daß man im Gesichtsfeld die beiden zu vergleichenden Färbungen nicht nebeneinander sieht, sondern so, daß das Bild der einen Lösung als eine Ellipse erscheint, um die das Bild der anderen Lösung streifenförmig herumliegt.

Während beim Dubosqschen Apparat beide Schichtdicken verändert werden können, besitzen andere Instrumente, z. B. das Chromophotometer nur eine veränderliche Schichtdicke, während die andere Lösung in einen Trog bekannter und unveränderlicher Tiefe eingefüllt wird. Die Berechnung ist naturgemäß die gleiche: für den praktischen Zweck ist es erwünscht, daß man eine Reihe von Trögen mit verschiedener Schichtdicke besitzt, da die Ablesung bei einer gewissen Farbtiefe am günstigsten ist: manche Färbungen sind in zu dünner Schicht überhaupt nicht zu vergleichen.

Ein für einige Spezialzwecke geeignetes kleines und wohlfeileres Instrument ist das Kolorimeter von Autenrieth. Das Autenriethsche Kolorimeter besitzt für die eine Versuchsflüssigkeit einen Trog, also unveränderliche Schichtdicke; die Veränderung der Schichtdicke der anderen Lösung erfolgt dadurch, daß man einen Keil, der mit der betreffenden Lösung gefüllt wird, vor einem Sehschlitz hin und her bewegen kann, bis die Tiefe der Färbung gerade der durch einen daneben gelegenen Schlitz beobachteten Tiefe der Färbung der anderen Lösung entspricht. Eine gewisse Schwierigkeit ist bei diesem Apparat dadurch gegeben, daß die Ausmessungen des Troges wie des Keils nicht ganz exakte sind. Im allgemeinen wird die Stellung des Keils durch eine in 100 Teile geteilte Skala gegeben. Es ist aber darauf zu achten, daß die Einstellung Null der Skala der größten Schichtdicke des Keiles, die Einstellung 100 der geringsten Schichtdicke, also praktisch der Farblosigkeit entspricht. Dementsprechend muß man die erhaltenen Resultate der Skalenablesung von 100 ab-

ziehen, um sie als Werte in die obengenannte Gleichung einsetzen zu können. Andererseits muß man den Apparat zunächst eichen und feststellen, welche Skalenablesung vorliegt, wenn man in den Trog und in den Keil eine gleich intensiv gefärbte Flüssigkeit einfüllt. Dieser „Nullpunkt“ ist zuerst zu bestimmen und sein Wert bei Ablesungen mit verschieden gefärbten Flüssigkeiten in Ansatz zu bringen. Für verschiedene Zwecke werden zu dem Authenriethschen Apparat mit Farblösungen gefüllte Keile geliefert, die für bestimmte Verfahren genau angepaßt sind. Für diese Farbkeile wird eine von der Fabrik hergestellte Eichungstabelle mitgeliefert, aus der man für jede Ablesung direkt die Menge der gesuchten Substanz ermitteln kann.

Die Handhabung der Kolorimeter erfordert gewisse Vorsichtsmaßregeln. Als Lichtquelle kann entweder Tageslicht oder auch eine nicht zu intensive künstliche Lichtquelle dienen. Besonders zweckmäßig ist in diesem Falle das Nernstlicht in Milchglasglocke oder auch eine gasgefüllte Glühlampe mit mattierter Birne. Die Lichtquelle muß, was durch Verstellen auszuproben ist, so aufgestellt sein, daß bei ungefülltem Kolorimeter oder, wenn in die beiden Tröge die gleiche Farblösung eingefüllt ist, die beiden Teile des Gesichtsfeldes durchaus gleich erscheinen. Dieser Zustand muß auf jeden Fall vor der Benutzung erreicht sein. Er ist bei jedem guten Kolorimeter, das ausreichend optisch korrigiert ist, zu erzielen. Natürlich muß das optische System peinlich sauber gehalten werden. Bei fortlaufenden kolorimetrischen Ablesungen ist die gleiche Lichtquelle und ihre gleiche Lage beizubehalten. Bei manchen Apparaten, z. B. dem Dubosq-Apparat von Schmidt & Haensch ist die Lichtquelle fest mit dem Kolorimeter verbunden, sodaß die Einstellung fortfällt. Die zur Kolorimetrie kommenden Farblösungen müssen absolut klar sein: jede Trübung verändert die Ablesung. Ein Filtrieren unklarer Lösungen führt nur selten zum erwünschten Ziel, in manchen Fällen werden auch färbende Substanzen durch das Filter zurückgehalten. Bei den hier beschriebenen kolorimetrischen Methoden werden bei richtigem Arbeiten durchweg klare Lösungen

erzielt — mit Ausnahme natürlich solcher Verfahren, bei denen eine Trübung absichtlich erzeugt wird. Es ist also, wenn nicht klare Lösungen erhalten wurden, das beste, den Versuch nochmals genau nach der Vorschrift zu wiederholen.

Verschiedene Färbungen lassen sich verschieden gut kolorimetrisch bestimmen: am besten blaue, am schlechtesten gelbe. Oftmals wird die Ablesung durch Vorsetzen eines farbigen Glases, z. B. einer Blauscheibe, erleichtert. Die exaktesten Resultate erhält man bei Benutzung des „Monochromators" (Schmidt & Haensch).

Die zur Bestimmung der Färbung einer Versuchslösung erforderlichen Vergleichslösungen bekannter Konzentration können auf verschiedene Weise hergestellt werden: es werden im speziellen Teil Beispiele dieser verschiedenen Arten mitgeteilt werden. Die einfachste und korrekteste Art ist die, daß Lösungen bestimmter Konzentration desselben Stoffes, der bestimmt werden soll, in ganz gleicher Weise behandelt werden wie die Versuchslösungen und daß durch Vergleich der Intensität der in der Versuchslösung erzeugten Färbung mit der der Vergleichslösung von bekanntem Gehalt die Konzentration der ersteren an dem gesuchten Stoffe festgestellt wird. In diesem Fall muß also auch die Färbung der Vergleichslösung jedesmal frisch hergestellt werden. Man kann diese Arbeit für manche Zwecke umgehen, indem man aus bekannten farbechten Substanzen eine Lösung herstellt, welche genau dieselbe Farbe und Farbenintensität aufweist wie eine Lösung bestimmter Konzentration des zu prüfenden Stoffes nach vorschriftsmäßiger Behandlung. Auf diesen Überlegungen basieren auch die obengenannten fertigen Keile für das Authenriethsche Kolorimeter. Endlich kann man empirisch — jedesmal frisch — aus anderen als den für die Analyse verwendeten Substanzen — eine Farblösung herstellen, die ebenfalls einer gewissen Konzentration der zu bestimmenden Substanz nach vorschriftsmäßiger Behandlung entspricht.

Als neueste Art der optischen Bestimmung kommt das nephelometrische Verfahren in Frage, das die durch Zusatz bestimmter Substanzen entstehenden Trübungen

mißt und die Konzentration einer gewissen Substanz in einer Flüssigkeit nach der Trübung dieser Substanz, verglichen mit der auf gleiche Art erzeugten Trübung einer Lösung bestimmter Konzentration beurteilt.

Nephelometrie.

Während für einfache Versuche die Kolorimeter, besonders wenn Versuchslösung und Vergleichslösung annähernd gleich konzentriert sind, genügen, ist für exakte Untersuchungen die Anwendung besonderer Apparate, sogenannter Nephelometer erforderlich, bei denen nicht wie im Kolorimeter der Durchfall des Lichtes durch eine bestimmte Schicht gemessen wird, sondern das Tyndallphänomen zum Maß des Vergleiches benutzt wird. Als für biologische Zwecke brauchbarstes Instrument dürfte das Kleinmannsche Nephelometer anzusehen sein. Genaue nephelometrische Untersuchungen begegnen heute noch ziemlich erheblichen Schwierigkeiten, insbesondere ist die Herstellung einer gleichmäßigen, feinverteilten Trübung recht schwierig, wenn man sich nicht genau an die Vorschriften hält. Irgendwelche sekundäre Trübungen (aus Verunreinigungen oder dgl.) machen die nephelometrische Analyse ganz unmöglich.

Abb. 4 zeigt den Apparat von der Seite. Die Reagensgläser a_1 und a_2, welche mit den zu vergleichenden trüben Flüssigkeiten gefüllt werden, werden von einer Lichtquelle, die hinter der Zeichnungsebene liegt und die unverrückbar zum Apparat so angebracht sein muß, daß bei gleicher Füllung beider Reagensgläser die Ablesung an beiden Skalen (s. u.) genau gleich sein muß, beleuchtet. Die entstehenden Tyndallkegel werden so beobachtet, daß das Beugungslicht zuerst zwei massive Glaszylinder b_1 und b_2 passiert: das Licht aus dem Gefäß a_2 wird auf die eine Hälfte, das des Gefäßes a_1 auf die andere Hälfte einer durch ein Okular beobachteten Kreisfläche projiziert.

Die Höhen der zu beobachtenden Schichten werden durch Metallplatten g_1 und g_2 bestimmt, die den Gefäßen

dicht anliegen und so den beleuchteten Teil scharf abschneiden. Die Länge der Schichten (in beifolgender Zeichnung nur der Schicht g_1) ist durch Verschiebung der Metallplatten veränderlich: sie kann an einer angebrachten Skala abgelesen werden.

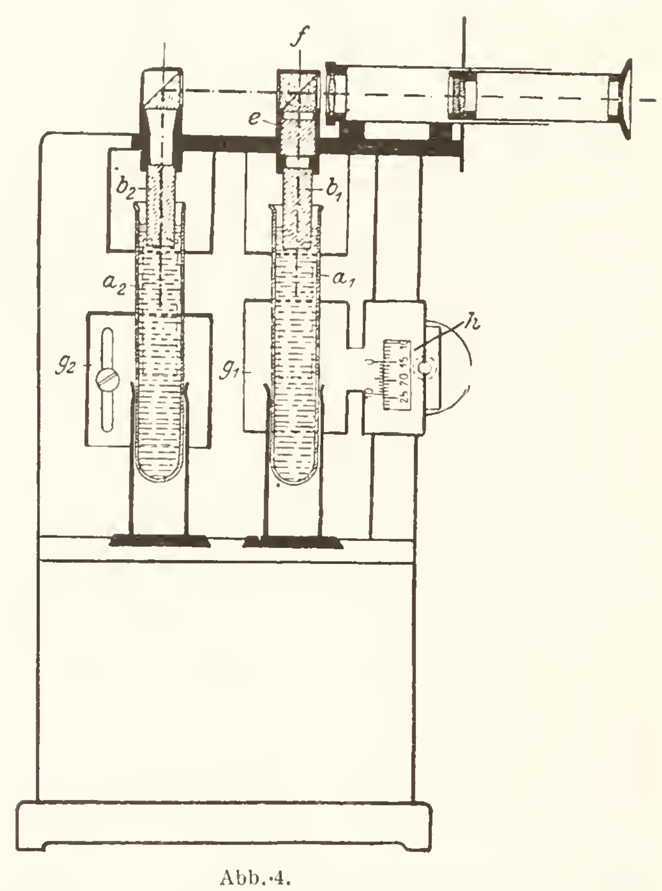


Abb. 4.

Die Handhabung und Berechnung entspricht vollständig den Verhältnissen bei den Kolorimetern. In vielleicht noch höherem Grade als bei diesen ist exaktestes Arbeiten, absolute Sauberkeit der Gefäße Bedingung. Die Lösungen müssen ganz frei von Luftblasen sein.

Endlich kommen für die Mikromethodik noch einige gasanalytische Methoden in Betracht. Ihre Prinzipien werden zugleich mit ihrer Anwendung auf die Blutgase am Schluß des Buches zusammenhängend behandelt werden.

Bestimmung der Harnbestandteile in kleinen Mengen.

Die hier beschriebenen Methoden entsprechen zum Teil den bisherigen für größere Mengen bestimmten, sind jedoch so abgeändert, daß die Ergebnisse auch bei Verwendung dieser kleinen Mengen durchaus zuverlässig sind.

Bestimmung der Halogene.

1. Volhardsches Prinzip.

Benötigte Lösungen: 1. $^1/_{50}$ Normal-Silbernitratlösung, 2. $^1/_{50}$ Normal-Rhodanammoniumlösung, 3. verdünnte Salpetersäure, 4. Eisenoxydammoniakalaun, gepulvert.

10 ccm einer Harnverdünnung 1 : 10 werden in einem kleinen Gefäß mit 1—2 ccm Salpetersäure und einer Messerspitze Alaun (4) versetzt, und aus einer in $^1/_{20}$ ccm geteilten Bürette mit Glashahn im Überschuß Silbernitrat zugefügt. Man gibt nun aus einer anderen gleichen Bürette von der Rhodanammonlösung zu, bis gerade Rotfärbung auftritt. Aus der verbrauchten Silbernitratlösung abzüglich der zum Zurücktitrieren verbrauchten Rhodanlösung ergibt sich die Menge des gebildeten Chlorsilbers und daraus die Menge des Chlors bzw. der Chloride.

Berechnung: 1 ccm $^1/_{50}$ Normal-Silbernitratlösung entspricht 0,71 mg Chlor bzw. 1,17 mg NaCl.

Beispiel: Angewandt 1 ccm Harn; es seien zugesetzt (im Überschuß) 10 ccm Silberlösung, zum Zurücktitrieren bis zur Rotfärbung seien erforderlich gewesen 1,4 ccm Rhodanlösung. Es sind also 8,6 ccm Ag-Lösung zur Bindung verbraucht. Die Chlormenge ergibt sich zu $8{,}6 \cdot 0{,}71 = 6{,}11$ mg in 1 ccm Harn, bei Berechnung des gesamten Chlors als NaCl die Menge dieses zu $8{,}6 \cdot 1{,}17 = 10{,}06$ mg NaCl in 1 ccm. 100 ccm enthalten dementsprechend 0,611 g Cl oder 1,006 g NaCl.

2. Mohrsches Prinzip.

Benötigte Reagentien 1. n/50 Silbernitratlösung; 2. Kaliumchromatlösung 10%; 3. Natronlauge n/10.

10 ccm Harn werden in einem Meßkölbchen zu 100 ccm mit n/10 Natronlauge versetzt, bis die Reaktion gegen

Lackmuspapier gerade neutral geworden ist. Darauf wird mit destilliertem Wasser bis zur Marke 100 aufgefüllt, gemischt und 10 ccm nach Zusatz von 0,5 ccm Kaliumchromatlösung mit n/50 $AgNO_3$-Lösung titriert, bis schwache Rotfärbung das Ende der Reaktion anzeigt.

Die Berechnung ist die gleiche wie für die Volhardsche Methode. Die verbrauchten Mengen n/50 $AgNO_3$ multipliziert mit 0,71 bzw. 1,17 geben den Cl- bzw. NaCl-Gehalt in mg. Bei beiden Methoden ist es zweckmäßig die Titration möglichst schnell zu beenden, da die Dunkelung des Chlorsilbers am Licht die Erkennung des Farbenumschlags erschwert.

Bestimmung der Phosphate.

Durch Zusatz von Molybdänsäure und Reduktion derselben wird eine Blaufärbung erzielt, welche kolorimetrisch mit der Färbung einer auf gleiche Weise behandelten Phosphatlösung bekannten Gehaltes verglichen wird.

Gebrauchte Reagentien: 1. Molybdänsäurelösung: 50 g Ammonmolybdat werden in 1000 ccm n/H_2SO_4 unter leichtem Erwärmen gelöst und wenn nötig filtriert. 2. Hydrochinonlösung: 20 g Hydrochinon werden in Wasser gelöst, auf 1000 ccm aufgefüllt und 1 ccm konzentrierter H_2SO_4 zugefügt. 3. Karbonat-Sulfitlösung: 1000 ccm einer 20%igen Lösung von Natriumkarbonat werden mit 500 ccm einer 15%igen Lösung von Natriumsulfit gemischt (gut verschlossen aufbewahren). 4. Standardlösung: 4,394 g trocknes primäres Kaliumphosphat werden in Wasser gelöst und die Lösung auf 1000 ccm aufgefüllt. Diese Lösung enthält im ccm 1 mg P. Sie wird zum Gebrauch auf das 20fache verdünnt, indem 5 ccm im Meßkolben auf 100 aufgefüllt werden.

A n o r g a n i s c h e P h o s p h a t e.

In Meßkolben von 25 ccm bzw. Röhrchen mit einer Marke bei 25 ccm, wird einerseits 2 ccm einer 10fachen Harnverdünnung (5 ccm Harn im Meßkolben auf 50 ccm verdünnt) andererseits 2 ccm der bereits verdünnten Standardlösung (Gehalt dieser 2 ccm 0,1 mg P) einge-

bracht. Zu beiden Proben wird 5 ccm Wasser zugegeben und durch leichtes Schütteln gemischt. Jetzt wird zu jeder Probe zunächst 1 ccm Molybdänsäurelösung (1) und darauf 1 ccm Hydrochinonlösung (2) zugefügt. Man läßt 5 Minuten stehen, fügt, nachdem man durch leichtes Schütteln gut gemischt hat, zu jeder Lösung 1 ccm Karbonat-Sulfitlösung (3) zu und füllt mit Wasser bis zur Marke 25 auf. Nach 5—10 Minuten wird im Kolorimeter verglichen.

Es ist darauf zu achten, daß der Harn mit Sediment zur Verwendung kommt. Besteht eine Trübung durch kristalline Ausscheidungen, so ist zur Lösung dieser leicht zu erwärmen, wenn auch dies nicht genügt, durch Zugabe von einigen Tropfen verdünnter Salzsäure eventuell ausgefallene Phosphate in Lösung zu bringen. Von anderweitigen Trübungen wird zweckmäßig vorher abfiltriert.

Die Berechnung gestaltet sich in üblicher Weise nach der Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$ wobei c_1 0,2 mg P bedeutet.

Beispiel: Es sei bei Farbengleichheit die Schichthöhe der Vergleichslösung 40, die der Harnlösung 48. Nach oben genannter Formel ergibt sich dann für den P-Gehalt in den angewandten 2 ccm verdünntem (= 0,2 ccm originalem) Harn die Menge des P zu $0{,}1 \cdot \frac{40}{48} = 0{,}0833$ mg P.

Zur Ermittlung in 100 ccm Harn muß diese Zahl mit 500 multipliziert werden, so daß sich der P-Gehalt in 100 ccm Harn zu 41,65 mg ergibt. Will man die Phosphorsäure (P_2O_5) wissen, so ist diese Zahl mit 2,29 zu multiplizieren.

Bestimmung der gesamten Phosphate. In einem Mikrokjedahlkolben werden 2 ccm einer 10fachen Harnverdünnung (wie oben) eingebracht und 5 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugefügt. Es wird auf einem Mikrobrenner abgedampft, bis sämtliches Wasser verdampft ist (es ist zweckmäßig, um Stoßen zu vermeiden, eine Glasperle hereinzutun) und der Inhalt des Kölbchens schwarz zu werden beginnt. Man läßt etwas abkühlen, gibt 0,5 ccm rauchende Salpetersäure zu und erhitzt mit größer werdender Flamme, bis keine bräunlichen Dämpfe

mehr entweichen, setzt dann auf die Öffnung ein kleines Trichterchen auf und erhitzt noch ungefähr 5 Minuten weiter. Es muß ein farbloser, geringer flüssiger Rückstand bleiben. Anderenfalls war die Veraschung nicht vollkommen, man setzt nochmals Salpetersäure zu und verfährt wie oben angegeben. Der klare Rückstand wird nach Erkalten mit 20 ccm Wasser versetzt und nochmals kurz aufgekocht, um eventuell noch vorhandene Salpetersäure zu entfernen. Darauf spült man den gesamten Inhalt des Kjeldahlkölbchens in einen Meßkolben von 100 ccm und spült mit 30 ccm Wasser nach. In ein zweites Meßkölbchen zu 100 gibt man 2 ccm der verdünnten Standardlösung (0,1 mg P in 2 ccm), ferner 5 Tropfen konzentrierte H_2SO_4 und gibt ebenfalls 50 ccm Wasser dazu. Nach leichtem Durchmischen wird zu beiden Proben zunächst 1 ccm Molybdänsäurelösung (1) und darauf 1 ccm Hydrochinonlösung (2) zugefügt. Man läßt 10 Minuten stehen und gibt dann in jedes Kölbchen 3 ccm Karbonat-Sulfitlösung (3), mischt leicht und füllt zur Marke auf. Vergleich im Kolorimeter und Berechnung genau so wie bei der Bestimmung der anorganischen Phosphate. Infolge der größeren Verdünnungen der Lösungen wählt man möglichst große Schichtdicken im Kolorimeter.

Bestimmung der Sulfate.

Prinzip: Die Sulfate werden mit Benzidinlösung ausgefällt und die Schwefelsäure durch Titration mit Natronlauge ermittelt.

Gebrauchte Reagentien: 1. Benzidinreagens. 2 g Benzidin werden mit ca. 5 ccm Wasser zu einem Brei verrieben und unter reichlichem Nachspülen mit Wasser in einen Meßkolben von 1000 ccm überführt. Es werden 2,5 ccm konzentrierte HCl (1,19) zugefügt, gut geschüttelt und zur Marke aufgefüllt. Lösung durch leichtes Erwärmen beschleunigen. 2. Benzidinsulfatlösung: ungefähr 1 g Benzidinsulfat wird in 1 l Wasser aufgeschwemmt, gut geschüttelt und von ungelösten abfiltriert. Das Filtrat wird mit der gleichen Menge Wasser verdünnt. 3. Konzentrierte HCl. 4. NaOH, 33%ig. 5. HCl

verdünnt (1 Teil konzentrierte + 4 Teile Wasser), 6. NaOH n/50. 7. α-Dinitrophenollösung 0,05%ige, wässrige Lösung. 8. Phenolphthalein, 1%ige alkoholische Lösung.

a) Bestimmung der freien Schwefelsäure. In ein Zentrifugenglas von ungefähr 15 ccm Fassungsraum werden 2 ccm Harn hereinpipettiert und 10 ccm Benzidinreagens (1) unter Umrühren zugefügt. Es wird 0,5 ccm Dinitrophenollösung (7) zugegeben und nun solange vorsichtig tropfenweise verdünnte HCl (5) zugefügt, bis die gelbe Farbe des Dinitrophenols gerade verschwunden ist und dann noch 0,5 ccm. Nach 10 Minuten langem Stehen wird der gebildete Niederschlag abzentrifugiert, was in wenigen Minuten erreicht ist. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen (am besten mit Hilfe der S. 77 beschriebenen Vorrichtung abgeblasen), an ihrer Stelle Benzidinsulfatlösung (2) zugegeben, gemischt, wieder zentrifugiert, danach wieder abgegossen und das Verfahren nochmals wiederholt. Die letzte Waschflüssigkeit darf Kongopapier nicht bläuen, sonst muß die Waschung mit Benzidinsulfat wiederholt werden. Man gießt nunmehr die Flüssigkeit ab und fügt zum Rückstand ungefähr 5 ccm destilliertes Wasser. In einem Wasserbad erhitzt man das Zentrifugenglas mit Inhalt zum Kochen, fügt 5 Tropfen Phenolphthaleinlösung (8) hinzu und titriert heiß mit n/50 NaOH aus einer Mikrobürette. 1 ccm n/50 NaOH = 0,98 mg H_2SO_4.

b) Bestimmung der gesamten Schwefelsäure (freie + gebundene). Um die gebundene Schwefelsäure aufzuspalten, werden 25 ccm Harn mit 10 ccm konzentrierter HCl (3) in einem Erlenmeyerkölbchen 15 Minuten zum gelinden Sieden erhitzt. Man läßt etwas abkühlen, gibt 1 g Blutkohle dazu und erhitzt nochmals 3 Minuten zum Sieden. Man überführt die durch das Erhitzen stark eingedunstete Mischung quantitativ in ein Meßkölbchen von 25 ccm und spült das Kölbchen, in welchem man erhitzt hatte, mit etwas Wasser aus, so daß man gerade bis zur Marke 25 auffüllt. Es wird nunmehr gut durchgemischt und durch ein Faltenfilter filtriert. Von dem klaren Filtrat werden 2 ccm wie oben beschrieben in ein Zentrifugenglas überführt, 10 ccm Ben-

zidinreagens (1) unter Mischen zugefügt und 0,5 ccm α-Dinitrophenol dazu gegeben. Die stark saure Lösung wird nun mit konzentrierter Natronlauge (4) tropfenweise solange versetzt, bis Auftreten einer Gelbfärbung die alkalische Reaktion anzeigt. Nunmehr wird wieder tropfenweise verdünnte HCl (5) gerade bis zum Verschwinden der Gelbfärbung zugefügt und weiter genau so verfahren, wie es bei der Bestimmung der freien Schwefelsäure beschrieben wurde. Die Titration mit n/50 NaOH ergibt die Summe der freien und gebundenen Schwefelsäure.

Beispiel: Zur Titration der freien Schwefelsäure wurden verbraucht 2,9 ccm n/50 NaOH. Da 1 ccm NaOH 0,98 mg H_2SO_4 entspricht, so war die in 2 ccm enthaltene Menge der Schwefelsäure $2{,}9 \cdot 0{,}98 = 2{,}84$ mg; 100 ccm enthalten also 142 mg freie H_2SO_4. Zur Titration der gesamten (freien + gebundenen H_2SO_4) wurden verbraucht 4,5 ccm NaOH, sodaß sich also die Menge der gesamten H_2SO_4 in 2 ccm zu $4{,}5 \cdot 0{,}98 = 4{,}41$ mg ergibt; 100 ccm enthalten dementsprechend 220,5 mg H_2SO_4. Die Menge der gebundenen Schwefelsäure berechnet sich aus der Differenz zu 78,5 mg in 100 ccm.

Bestimmung des Natriums[1].

Prinzip: Nach Zerstörung der organischen Substanz wird das Natrium mit dem Bellschen Reagens gefällt und das in dem Komplexsalz enthaltene Wismut mit einer Standardlösung von Wismutsulfat verglichen, indem in beiden Lösungen Wismutsulfid ausgefällt wird. Da in dem Komplexsalz das Wismut in einer bekannten Beziehung zum Natrium steht, läßt sich dieses daraus berechnen.

Gebrauchte Reagentien: 1. Bellsches Reagens (Kalium-Caesium-Wismut-Nitrit). 30 g natriumfreies Kaliumnitrit (das Mercksche reinste Präparat entspricht den Anforderungen) werden in einem Meßkolben von 100 ccm in ungefähr 60 ccm destilliertem Wasser aufgelöst — andererseits werden 3 g Wismutnitrat in wenig 2 n HNO_3

[1]) Auf Grund von Mitteilungen von Prof. Spiro, Basel.

aufgelöst und zur Nitritlösung zugegeben. Wenn sich ein Niederschlag bilden sollte, wird vorsichtig unter Umschwenken verdünnte Salpetersäure zugegeben, bis der Niederschlag gelöst ist. In einem anderen Gefäß wird 1,6 g Caesiumnitrat mit 1 ccm 2 n HNO_3 versetzt, gelöst (wenn nötig wenig Wasser zufügen) und ebenfalls in das Kölbchen hereingegeben. Es wird auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösung muß durchsichtig klar und gelborange sein. Bildet sich ein Niederschlag, der auf Natriumgehalt der Reagentien zurückzuführen ist, so läßt man 24 Stunden stehen und filtriert dann ab. Die Lösung muß im Eisschrank bei möglichst niedriger Temperatur (am besten bei 2 Grad) aufgehoben werden. Zweckmäßig ist, wenn man etwas Leuchtgas, das man durch Passieren einer Waschflasche mit Wasser vom H_2S gereinigt hat (s. u.), in die Flasche hereinströmen läßt, bevor man sie verkorkt und fortstellt. 2. Azeton; 3. 50%ige Azetonlösung, welche mit dem Reagens gesättigt ist. 50 ccm Azeton + 50 ccm Wasser werden mit dem Reagens (1) solange versetzt, bis sich ein Niederschlag bildet: es wird vom Niederschlag abfiltriert und die erhaltene Lösung in verschlossener Flasche aufbewahrt. 4. 2 n HNO_3. 5. Gummiarabikumlösung: ein Teil reinstes Gummiarabikum wird mit 2 Teilen Wasser durch längeres Stehen bei Zimmertemperatur (Vorschrift des Arzneibuches) aufgelöst und stehen gelassen, bis die Verunreinigungen sich zu Boden gesetzt haben. Eine solche Lösung hält sich im Eisschrank verhältnismäßig lange. Von der klaren Lösung wird 1 Teil mit Wasser auf 50 zum Gebrauche verdünnt. 6. Salpetersäure, konzentriert, natriumfrei. 7. Schwefelwasserstoffwasser, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in destilliertes Wasser frisch zu bereiten. 8. Wismut-Standard-Lösung: 77,1 mg bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Wismutsulfat werden in einem 1000 ccm Meßkolben in 50 ccm 2 n HNO_3 aufgelöst und bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. 10 ccm dieser Standardlösung enthalten 0,227 g Wismut, was beim Vergleich mit der aus dem Harn gewonnenen Lösung des Komplexsalzes 0,03 mg Natrium entspricht.

1 ccm Harnverdünnung 1:10 wird in einem großen Jenaer Reagensglas mit 1 ccm konzentrierter Salpetersäure gelinde und vorsichtig erhitzt, bis sich braune Dämpfe entwickeln. Man gibt noch einmal ungefähr 0,5 ccm konzentrierte Salpetersäure hinzu und erhitzt wiederum bis zur Entwicklung der Dämpfe (kurze Entzündung schadet nichts). Man gibt zum Rückstand einige ccm Wasser, worauf sich dieser klar und farblos lösen muß. Ist dies nicht der Fall, so gibt man nochmals Salpetersäure hinzu und wiederholt die Prozedur. Man fügt nun zur klaren Lösung ungefähr 10 ccm Wasser, dampft zunächst die überschüssige Salpetersäure ab und überführt die Lösung in ein 50 ccm Meßkölbchen; man spült mit Wasser wiederholt nach und füllt endlich das Kölbchen mit destilliertem Wasser auf 50 ccm auf. Ungefähr 12 ccm der gemischten Lösung werden nun in ein Zentrifugengläschen aus Jenaer Glas gebracht und klar zentrifugiert. 10 ccm der klaren Lösung, welche also 0,2 ccm Harn entsprechen, werden in ein Jenaer Erlenmeyer-Kölbchen von ungefähr 30 ccm eingebracht und vorsichtig abgedampft, sodaß noch ungefähr 1 ccm Rückstand bleibt. Nach dem Erkalten wird hierzu 6 ccm Reagens zugefügt (für 1 mg Natrium sind ungefähr 3 ccm Reagens erforderlich). Das Reagens ist vorher gut zu kühlen. Zum Verschluß des Kölbchens dient ein Gummistopfen, durch den 2 rechtwinklig gebogene Glasrohre eingeführt sind, die an ihrem äußeren Ende einen mit einer Klemme armierten Gummischlauch tragen. Man läßt nun (s. Abb. 5) unter Öffnung der Klemmen einige Sekunden H_2S-freies Leuchtgas durch das Kölbchen durchstreichen, schließt dann mit den Klemmen gut ab und stellt das so verschlossene Kölbchen in den Eisschrank. Bei einer Temperatur von 0—2 Grad muß es ungefähr 20 Stunden, bei höherer ungefähr 2 mal 24 Stunden zur völligen Ausfällung stehenbleiben.

Nach dieser Zeit muß der gebildete gelbe Niederschlag des Komplexsalzes $9\,CsNO_2 \cdot 6\,NaNO_2 \cdot 5\,Bi\,(NO_2)_3$ abfiltriert werden, was mit Hilfe des Jenaer Glasfilters 12 G 3/5 bis 7 geschieht. Das Mikrofilter wird mit einem Gummistopfen auf ein Absaugekölbchen aufge-

setzt, der Niederschlag mit der Flüssigkeit auf die Filterfläche aufgebracht und das Filtrat nochmals benutzt, um die Reste des Niederschlages von den Glaswänden des Kölbchens abzuspülen und ebenfalls auf das Filter heraufzubringen. Ohne daß man saugt, gibt man ungefähr 10 ccm der vorher in Eis gekühlten Azetonlösung (3) auf das Filter herauf, und saugt jetzt schnell ab: dieses Verfahren wird noch 2 mal wiederholt. Man gibt nun in das Filter hintereinander 3 mal je 5 ccm eisgekühltes Azeton (2) und saugt jedesmal langsam ab,

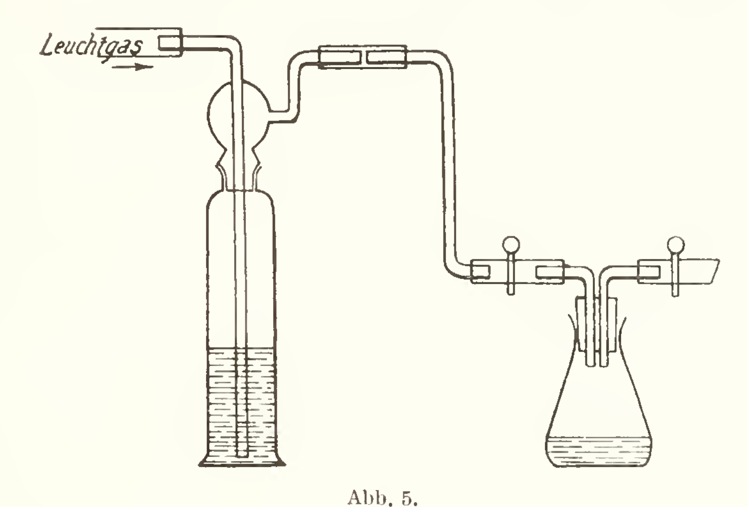


Abb. 5.

bis endlich das Azeton ganz und gar verschwindet. Gelegentlich enthält der Niederschlag außer dem Komplexsalz noch etwas auskristallisiertes Nitrit, was aber ohne Bedeutung für die Reaktion ist.

Man nimmt nun das Filter von der Pumpe ab und setzt es auf ein Meßkölbchen von 100 ccm auf. Man gibt in 3 Portionen im ganzen 10 ccm 2 n HNO_3 (4) auf die Filterfläche, wodurch das Komplexsalz in Lösung geht und diese in das Meßkölbchen hereinfiltriert. Zum Schluß spült man wiederholt das Filter mit destilliertem Wasser aus (ungefähr 15 ccm in einigen Portionen) und füllt, nachdem alles durchfiltriert ist, das Meßkölbchen bis zur Marke 100 auf.

Mit der so gewonnenen und gut durchmischten Lösung wird die kolorimetrische Bestimmung angestellt. Man

bringt in einen hohen Meßzylinder von 25 ccm 5 ccm der Lösung ein und fügt 5 ccm destilliertes Wasser dazu. (Sind die Natriummengen sehr gering, so kann man auch 10 ccm Lösung ohne Wasserzusatz hereingeben.) In einen zweiten gleichen Meßzylinder gibt man 10 ccm der Vergleichslösung (8), welche 0,227 mg Wismut enthalten, die also 0,03 mg Natrium entsprechen. In beide Meßzylinder gibt man sodann 5 ccm der bereits verdünnten Gummiarabikumlösung und endlich nach Durchmischen in beide Meßzylinder je 10 ccm frisch bereitetes Schwefelwasserstoffwasser. Die durch das ausgefällte Wismutsulfid, das durch das Schutzkolloid Gummiarabikum in Lösung gehalten wird, erzeugten Braunfärbungen werden im Kolorimeter miteinander verglichen.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß der Wismutgehalt der Testlösung so groß ist, daß 10 ccm davon 0,03 mg Natrium der Komplexverbindung entsprechen. In der kolorimetrischen Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$ bedeutet also c_1 0,03 mg Natrium, während s_1 bzw. s die Schichtdicken der Standardlösung bzw. der Versuchslösung bedeuten. Aus dem so ermittelten Wert wird der Natriumgehalt des Harnes unter Berücksichtigung der Verdünnungsverhältnisse berechnet.

Beispiel: In Arbeit genommen 1 ccm Harn, der schließlich auf 50 ccm aufgefüllt war. 10 ccm davon, entsprechend 0,2 ccm Harn, zur weiteren Analyse und Fällung verwandt. Das aus dieser Harnmenge enthaltene Komplexsalz wurde auf 100 ccm aufgefüllt und hiervon der 20. Teil, 5 ccm, entsprechend also 0,01 ccm Harn, zur kolorimetrischen Analyse benutzt. Bei Farbengleichheit sei die Schichtdicke der Vergleichslösung $s_1 = 30$, die der Versuchslösung $s = 36$. Es ergibt sich also der Natriumgehalt der zur kolorimetrischen Bestimmung verwandten Menge zu 0,03 mg $\cdot \frac{30}{36}$ Natrium, oder 0,025 mg Natrium. Wie angegeben, entspricht die zu der kolorimetrischen Analyse angewandte Flüssigkeitsmenge 0,01 ccm Harn: die Menge Natrium in 100 ccm Harn ergibt sich

also hieraus durch Multiplikation mit 10000, so daß der Natriumgehalt des Harnes 250 mg oder 0,250 g in 100 ccm Harn beträgt.

Bestimmung des Kaliums.

Prinzip: Kalium wird mit Kobaltnitrit als Kaliumkobaltnitritverbindung gefällt und titrimetrisch bestimmt.

Gebrauchte Reagentien: 1. die S. 76 für die Kaliumbestimmung im Blut beschriebene Kobaltnitritlösung. 2. 20 volumen-$^0/_0$ige Schwefelsäure (20 ccm konzentrierte Schwefelsäure + 80 ccm destilliertes Wasser). 3. 1/50 normal Oxalsäurelösung. 4. 1/50 normal Kaliumpermanganatlösung.

Der Harn wird mit destilliertem Wasser auf das 10fache verdünnt. Zu 2 ccm der Verdünnung werden 2 ccm des Kobaltnitritreagenses zugefügt und die Mischung nach Umrühren mit einem feinen Glasstab eine halbe Stunde lang stehengelassen. Danach wird 2—3 ccm Wasser zugefügt, mit einem feinen Glasstab durchmischt und zentrifugiert; die klare überstehende Lösung wird entweder mit der S. 77 angegebenen Vorrichtung abgehebert oder auch einfach abgegossen; ungefähr 10 ccm Wasser zugefügt, mit einem feinen Glasstäbchen sehr vorsichtig gemischt und wieder zentrifugiert, nachdem wieder abgegossen und dies so oft wiederholt, bis die überstehende Lösung ganz farblos geworden ist. Man gießt nun wiederum die wasserklare Lösung ab, fügt 5 ccm n/50 Kaliumpermanganatlösung und 1 ccm der 20$^0/_0$igen Schwefelsäure hinzu und erwärmt im kochenden Wasserbad $1^1/_2$ Minuten lang. Ist die rote Farbe des Permanganats dann verschwunden, so wird noch 2 ccm Permanganat zugefügt und das Erhitzen eine weitere halbe Minute lang fortgesetzt. Wenn noch eine Rötung bestehen blieb, so gibt man unter leichtem Umrühren mit einem Glasstab 2 ccm n/50 Oxalsäurelösung zu, worauf sich die Lösung vollständig entfärben muß. Ist dies nicht der Fall, so ist noch eine weitere gemessene Menge Oxalsäurelösung hinzuzufügen. Nunmehr wird aus einer Mikrobürette mit der n/50 Permanganatlösung so lange titriert, bis ein rosafarbener

Ton auftritt, der mindestens 1 Minute lang bestehen bleibt. Die Menge der im ganzen verbrauchten n/50 Permanganatlösung (vorher zugegeben + bei der Titration verbrauchte) minus zugegebene Oxalsäurelösung multipliziert mit 71 ergibt die Milligramm Kalium in 100 ccm Harn.

Beispiel: Angewandt 2 ccm Harn 1:10; zugesetzt 5 ccm n/50 Permanganatlösung, darauf zugefügt 2 ccm Oxalsäurelösung. Zur Titration bis zur Rotfärbung erforderlich 0,55 ccm Permanganat. 5,0 — 2,0 + 0,55 = 3,55. Diese mal 71 ergeben 252 mg = 0,252 g in 100 ccm Harn oder 0,252 %.

Bestimmung des Kalziums.

Prinzip: Das Kalzium wird als Kalziumoxalat gefällt und die Oxalsäure mit Permanganatlösung titrimetrisch bestimmt.

Gebrauchte Reagentien: 1. Ammoniumoxalatlösung gesättigt. 2. Ammoniaklösung 10 %ig. 3. Essigsäure verdünnt. 4. Kaliumpermanganatlösung 1/100 normal. 5. n-Schwefelsäure.

2 ccm Harn (wenn nicht klar, mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt erwärmen und dann filtrieren) werden in ein Zentrifugenglas eingebracht und einige Tropfen Ammoniaklösung zugefügt, bis sich kein stärkerer Niederschlag mehr bildet. Man gibt dann so viel Essigsäure hinzu, bis der Niederschlag verschwunden ist und die Lösung deutlich sauer gegen Lackmuspapier reagiert. Unter leichtem Mischen wird nunmehr 1 ccm der Oxalatlösung (1) zugegeben und ½ Stunde stehen gelassen. Es wird jetzt nach Zugabe von ca. 5 ccm Wasser scharf abzentrifugiert, die überstehende klare Lösung entfernt, unter leichtem Aufrühren wieder ungefähr 8—10 ccm destilliertes Wasser zugefügt, wieder zentrifugiert und nachdem wieder abgegossen. Das wird so oft wiederholt (2—3 mal), bis die überstehende Lösung wasserklar geworden ist. Die letzte Waschflüssigkeit wird wieder abgegossen, zum Rückstand 5 ccm Normalschwefelsäure (5) zugegeben, und nach Umrühren mit einem Glasstab das Zentrifugenglas in ein Wasserbad von un-

gefähr 80 Grad eingestellt. Nachdem es dessen Temperatur angenommen hat, wird es herausgenommen und mit n/100 Kaliumpermanganat titriert, bis eine schwache Rotfärbung 1 Minute lang bestehen bleibt.

Die verbrauchten ccm Permanganat multipliziert mit 10 ergeben direkt die mg Kalzium in 100 ccm Harn.

Beispiel: Angewandt 2 ccm Harn, zum Titrieren verbraucht 1,61 ccm n/100 Permanganat. 100 ccm Harn enthalten 16,1 mg Ca oder 0,0161 %.

Bestimmung des Magnesiums.

Prinzip: In der vom Kalzium befreiten Harnlösung wird das Magnesium mit Ammoniumphosphat ausgefällt und der Phosphor in der erhaltenen phosphorsauren Ammoniakmagnesia kolorimetrisch bestimmt. Hieraus wird auf die Menge des Magnesiums geschlossen.

Gebrauchte Reagentien: 10%ige Lösung von sekundären Ammoniumphosphat $(NH_4)_2HPO_4$. 2. Ammoniak 25%ig. 3. Ammoniak, 10%ig; 4. Ammoniakalkohol: 20 ccm Ammoniak + 80 ccm Alkohol 95%ig; 5. n/10 HCl; 6. Molybdänlösung; 7. Hydrochinonlösung; 8. Karbonat-Sulfitlösung (Herstellung von 6., 7., 8. vgl. bei Bestimmung der Phosphate im Harn), 9. Phosphat-Standardlösung: 4,394 g trocknes Kaliumphosphat $(KH_2 PO_4)$ werden in destilliertem Wasser aufgelöst und die Lösung auf 1 l verdünnt. Von dieser Stammlösung, von der 1 ccm 1 mg Phosphor enthält, wird eine 100fache Verdünnung hergestellt, indem 10 ccm auf 1000 aufgefüllt werden. Von dieser Lösung enthält 1 ccm 0,01 mg Phosphor, 10 ccm 0,1 mg Phosphor.

Zur Bestimmung des Magnesiums muß zunächst das Kalzium entfernt werden. Die beim Abzentrifugieren des Kalziumoxalatniederschlages (S. 32) abgegossene Lösung wird in einem Zentrifugenglas mit 1 ccm der Phosphatlösung (1) und 2 ccm Ammoniak (2) versetzt, mit einem feinen Glasstab die Wandungen des Glases ziemlich stark gerieben und danach das Zentrifugenglas über Nacht stehengelassen. Es scheidet sich in dieser Zeit, wenn durch das genannte Reiben die Bedingungen für die Ausfällung günstig gestaltet worden sind, die Ver-

bindung des Magnesiums mit dem phosphorsauren Ammoniak aus. Man zentrifugiert scharf ab, entfernt die überstehende Flüssigkeit und wäscht den Rückstand, wie wiederholt geschildert, 2 mal mit der 10%igen Ammoniaklösung, ein drittes Mal mit der alkoholischen Ammoniaklösung aus. Man bringt dann das Gläschen in ein siedendes Wasserbad, nachdem man die alkoholische Lösung abgegossen hat und beläßt es dort so lange, bis der Rückstand ganz trocken geworden ist. Man fügt nun 1 ccm n/10 HCl hinzu, und läßt ungefähr 2 Stunden bis zur vollständigen Lösung stehen, die man durch leichtes Umrühren mit einem feinen Glasstab beschleunigen kann. Man bringt nunmehr die Lösung quantitativ unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in ein Meßkölbchen von 50 ccm Inhalt und füllt zur Marke auf. Man gibt nun in ein Kölbchen von 25 ccm 10 ccm dieser (gut durchmischten) Lösung, also $^1/_5$ der Gesamtmenge. In ein zweites gleich großes Meßkölbchen bringt man 10 ccm der verdünnten Phosphatstandardlösung mit einem P-Gehalt von 0,1 mg. Man gibt in beide Kölbchen je 1 ccm Molybdänlösung, darauf 1 ccm Hydrochinonlösung, mischt leicht um und läßt 5—8 Minuten stehen. Hierauf fügt man in jedes Kölbchen 1 ccm der Karbonat-Sulfitlösung, mischt, füllt mit destilliertem Wasser zur Marke auf, und vergleicht im Kolorimeter.

Die Berechnung des Phosphorgehaltes erfolgt nach der bekannten kolorimetrischen Formel $c_1 = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$, wobei c_1 den P-Gehalt der Standardlösung, 0,1 mg, s_1 die Schichtdicke der Standardlösung, s die Schichtdicke der Versuchslösung bedeutet. Aus dem auf diese Weise ermittelten P-Gehalt berechnet sich der Mg-Gehalt der Harnprobe entsprechend dem Gehalt an Mg in der phosphorsauren Ammoniak-Magnesia ($Mg(NH_4)PO_4$) durch Multiplikation mit 0,784. Wenn, wie bei dem hier angegebenen Verfahren 2 ccm Harn zur Bestimmung angewandt worden waren, von denen der 5. Teil, also 0,4 ccm, zum Vergleich gebraucht wurde, berechnet sich der Mg-Gehalt in 100 cm aus der so gefundenen Zahl durch Multiplikation mit 250.

Beispiel: Es wurde die bei der Fällung des Kalziums aus 2 ccm Harn resultierende Flüssigkeit weiter verarbeitet und schließlich der 5. Teil zu kolorimetrischer Analyse verwendet. Farbengleichheit im Kolorimeter war erreicht, als die Schichtdicke der 100fach verdünnten Standardlösung 55, die der Versuchslösung ($^1/_5$ der ursprünglichen Menge) 50 mm betrug. Die Menge des P in den angewandten 0,4 ccm Harn berechnet sich also zu $0{,}10 \cdot \frac{55}{50} = 0{,}11$ mg, also in 100 ccm zu $0{,}11 \cdot 250 = 27{,}5$ mg. Die Menge des Magnesiums ist, wie oben ausgeführt, also $27{,}5 \text{ mg} \cdot 0{,}784 = 21{,}56$ mg in 100 ccm oder 0,02156%.

Bestimmung von Ammoniak.

Prinzip: Freimachen des Ammoniaks aus dem Harn durch Zusatz von Alkali, Überdestillieren mit Luftdurchsaugung unter gelinder Erwärmung und Auffangen des Ammoniaks in einer titrierten Schwefelsäurelösung. Titrimetrische Bestimmung.

Erforderlich: 1. n/50 H_2SO_4; 2. n/50 NaOH, zu bereiten aus den allgemein verwandten n/10 Lösungen durch Verdünnen von 100 ccm auf 500 ccm mit Wasser im Meßkolben. Die Lösungen sind unbeschränkt haltbar, sind jedoch vor dem Gebrauch genau zu prüfen, ob sie einander entsprechen; 3. Indikator: wässerig-alkoholische Lösung von Methylrot, in saurer Lösung rot, in alkalischer gelb. Darstellung: 0,1 g Methylrot werden in 300 ccm 90%igem Alkohol gelöst und 200 ccm destilliertes Wasser zugefügt; 4. Gesättigte Na_2CO_3-Lösung.

Zur Destillation dient folgender einfacher Apparat (Abb. 6). Das große Jenaer Reagensglas A ist mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen armiert, durch dessen eines Loch das bis fast auf den Boden reichende Glasrohr b gesteckt ist, welches oben in einen Trichter c ausgeweitet ist. Durch die andere Öffnung führt ein Glasrohr d, dessen Mündung kurz unter dem Stopfen liegt. Es ist zweimal rechtwinklig umgebogen und besitzt in der Mitte eine kugelförmige Erweiterung, um etwaige Spritzer bei der Destillation unschädlich zu machen. Im gleichen

Sinne kann man auch ein Rohr von der Form f gebrauchen, das Spritzer noch sicherer zurückhält. Als Auffangegefäß dient ein Standgefäß oder ein gleiches Jenaer Reagensglas F, das ebenfalls mit einem doppelt durchbohrten Stopfen armiert ist. Durch die eine Öffnung desselben wird ein bis auf den Boden reichendes Rohr g gesteckt, das mit dem absteigenden Schenkel des Rohres d

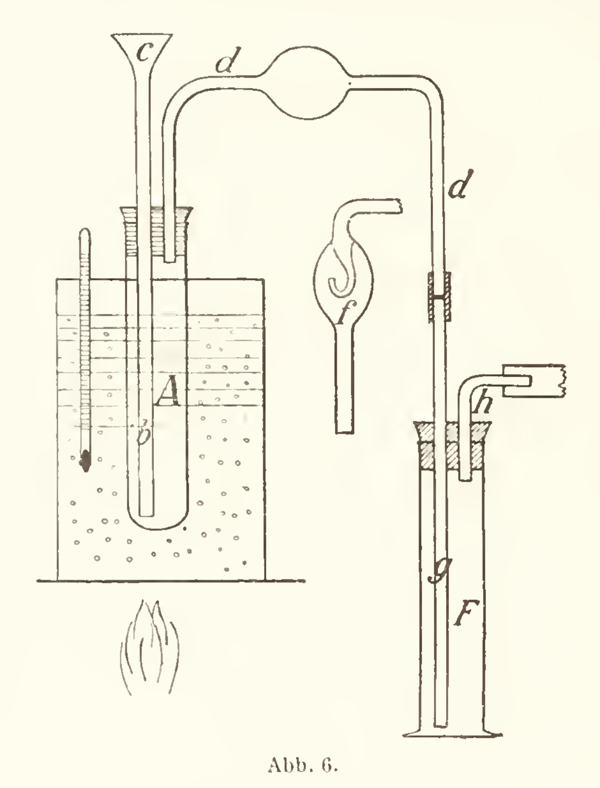


Abb. 6.

durch ein gut schließendes Stück Gummischlauch Glas an Glas verbunden ist. Durch die andere Bohrung führt ein rechtwinklig gebogenes Rohr h, an welches an der anderen Seite ein zur Wasserluftpumpe führender Schlauch aufgesetzt ist. Das Reagensglas A taucht in ein Becherglas oder ein Blechgefäß mit Wasser ein, das durch eine kleine Flamme auf 45 Grad erwärmt wird.

Zur Bestimmung des Ammoniaks wird der Apparat auseinander genommen. In das Aufnahmegefäß F werden 5 ccm n/50 Schwefelsäure und 2—3 ccm destilliertes

Wasser eingefüllt. Das Reagensglas A wird mit Hilfe einer Vollpipette mit 1 bis 2 ccm Harn (je nach der Menge des zu erwartenden Ammoniaks) beschickt. Der Harn muß ganz frisch sein, da in altem Harn sich leicht Ammoniak aus anderen Substanzen bildet. Ist es nicht möglich, ganz frischen zu verwenden, so muß derselbe konserviert werden, was am leichtesten durch deutliche Ansäuerung mit Schwefelsäure und Aufbewahrung in gut verkorkten Flaschen im Eisschrank geschieht. Man fügt zu dem Harn im Reagensglas ca. 5 ccm Wasser, ferner einen Tropfen einer 1%igen alkoholischen Phenolphthaleinlösung (um zu sehen, ob die später zuzusetzende Menge Alkali genügt hat, um eine alkalische Reaktion zu erzeugen), ferner einige Tropfen eines indifferenten Körpers, der bestimmt ist, das Schäumen der Lösung bei der Destillation und Luftdurchsaugung zu verhindern. Für diesen Zweck eignen sich einige Tropfen Caprylalkohol oder Oktylalkohol, ferner Terpentin (nicht rektifiziertes Terpentinöl), endlich — wohl am billigsten — einige Tropfen Vaselinöl (Paraffinum liquidum), die nur den Nachteil haben, daß die Gefäße etwas verschmiert werden. Man stellt den Apparat entsprechend der Skizze zusammen, wobei man darauf achten muß, daß die Stopfen gut schließen, die Röhren fest in den Stopfen sitzen, die Verbindung zwischen d und g fest ist und endlich die Röhren b und g möglichst tief in die Flüssigkeit in den betreffenden Gefäßen eintauchen. Man saugt nun durch Öffnen der Luftpumpe einen leichten Luftstrom durch und erwärmt das Wasserbad auf die gewünschte Temperatur. Durch den Trichter c gießt man ungefähr 1 ccm der Natriumkarbonatlösung ein (war der Harn angesäuert, mehr!) und spült mit einigen Tropfen Wasser nach. Die Lösung muss nun alkalisch, also rotgefärbt sein. Man saugt stärker, darauf achtend, daß kein Spritzen der Flüssigkeit eintritt. Nach einer Destillationsdauer von 20 Minuten stellt man die Pumpe ab, löst die Verbindung zwischen d und g und nimmt den Stopfen von F ab, indem man das Rohr g mit einigen Tropfen Wasser von innen und außen abspült. Zu der Flüssigkeit in F gibt man 2 bis 3 Tropfen der Methylrotlösung — größere Mengen lassen den Um-

schlag weniger deutlich erscheinen, doch ist das individuell verschieden — und titriert aus einer gewöhnlichen in $^{1}/_{20}$ ccm geteilten Bürette oder aus einer Mikrobürette mit $^{1}/_{50}$ n-Natronlauge bis zum scharfen Umschlag in gelb. Hat man übertitriert, kann nach der gewöhnlichen Regel der Maßanalyse wieder eine bestimmte Menge n/50 Schwefelsäure zugefügt und dann wiederum bis zum Umschlag in gelb titriert werden. Zur Titration stellt man das Gefäß F auf eine weiße Platte oder ein Stück weißes Papier, weil so der Umschlag deutlicher erkennbar ist.

Berechnung: 1 ccm n/50 Schwefelsäure entspricht 0,34 mg Ammoniak. Wurden z. B. 5 ccm n/50 Schwefelsäure in dem Gefäß F vorgelegt und wurden zur Titration 3,5 ccm n/50 NaOH verbraucht, so beträgt die Menge Ammoniak, welche aus dem Harn freigemacht und in der Schwefelsäure aufgefangen wurde, $5{,}0 - 3{,}5 = 1{,}5 \cdot 0{,}34$ mg $NH_3 = 0{,}51$ mg NH_3 in der zum Versuch angewandten Harnmenge (1 ccm). Die Menge in 100 ccm ergibt sich hieraus durch entsprechende Multiplikation.

Die Methode gibt genaue Werte, welche denen mit größeren Mengen durchaus ebenbürtig sind. Ohne Erwärmung gelingt eine vollständige Austreibung des Ammoniaks nur in sehr langer Zeit; andererseits darf die Temperatur nicht höher als 50 Grad sein, da sonst eine Bildung von Ammoniak aus anderen Substanzen, besonders Harnstoff, erfolgen kann. Eine Kühlung ist nicht notwendig.

Bestimmung des Harnstoffs.

Prinzip: Harnstoff wird durch Urease in Ammoniak übergeführt und das gebildete Ammoniak zusammen mit dem präformierten durch Titration bestimmt. Durch Zusatz eines Phosphatgemisches wird die Ureasewirkung gefördert.

Erforderlich die für die Ammoniakbestimmung nötigen Reagentien, ferner eine Phosphatlösung: 83,5 g sekundäres Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 + 12H_2O$) und 13,6 g primäres Kaliumphosphat (KH_2PO_4) werden zusammen zu 1000 ccm in Wasser gelöst.

Ureaseferment. Zur Darstellung wird nach Jacoby feines Sojamehl in eine große Porzellannutsche eingeschüttet, deren unterer Ablauf mit einem Schlauch mit

Quetschhahn verschlossen ist. Man übergießt das feine Mehl mit Petroläther, den man eine Stunde darauf läßt, läßt dann den Petroläther, der einen Teil des Fettes aus dem Mehl aufgenommen hat, ab, schließt den Quetschhahn wieder, gießt neuen Äther darauf und wiederholt diese Behandlung noch weitere vier Mal. Das auf diese Art entfettete Sojamehl wird auf Glasplatten ausgebreitet und über Nacht trocknen gelassen. Der Petroläther kann durch Abdestillieren aus der fetthaltigen Lösung wiedergewonnen werden. Das entfettete getrocknete Mehl wird mit der 5fachen Menge Wasser in einer gut schließenden Flasche übergossen und 16 bis 24 Stunden nach gutem Umschütteln — zweckmäßig ist im Anfang ungefähr 1stündiges Durchschütteln im Schüttelapparat — im Eisschrank aufbewahrt. Die oben stehende milchige Flüssigkeit wird durch ein gewöhnliches Filter abgegossen oder noch besser abzentrifugiert. Man trocknet sie sodann in Glasschalen mit flachem Boden durch Überleiten von Luft bei 30—35 Grad, am besten im Faustschen Apparat. Es bleibt eine hornartige Masse zurück, die abgekratzt, zu feinem Pulver verrieben und in einer gut verschlossenen Glasstöpselflasche aufbewahrt wird. Das so gewonnene Ferment ist außerordentlich aktiv. Noch fermentreicher als Sojabohnenmehl ist nach Folin das Mehl der Jackbohne (Canavalia ensiformis).

Zur Bestimmung des Harnstoffs nach der Mikromethode ist der Harn zu konzentriert: man verdünnt auf das 10fache (5 ccm Harn auf 50 ccm im Meßkolben aufgefüllt und gut gemischt) und nimmt von dieser Verdünnung 1 ccm entsprechend 0,1 ccm Harn. Zum Zweck der Konservierung angesäuerter Harn ist vorher ungefähr zu neutralisieren. Diese 1 ccm verdünnten Harnes werden mit einer Vollpipette in das Gefäß A hineinpipettiert, dazu 1 ccm Phosphatlösung und ungefähr 0,1 g Ureasepräparat zugefügt und mit ungefähr 1 ccm destilliertem Wasser verdünnt. Da schon geringe Metallspuren die Ureasewirkung verhindern, müssen Gefäße benutzt werden, welche von diesen (z. B. Kupfersulfat) ganz frei sind. Waren vorher in dem Gefäß Metallverbindungen, so muß peinlichst mit Säure gereinigt und nachher sehr gut nach-

gespült werden. Man schließt das Reagensglas mit einem Stopfen oder einem Wattebausch und läßt die Mischung 15 Minuten in einem Wasserbad oder einem Wärmeschrank von 50 bis höchstens 55 Grad stehen. Nach dieser Zeit ist der gesamte Harnstoff in Ammoniak verwandelt: die Destillation erfolgt genau, wie beim Ammoniak beschrieben worden ist, nach Alkalisierung unter Luftdurchsaugung, doch ist es nicht nötig, die Temperatur auf 50 Grad zu belassen: man kann ohne Schaden auf 60 Grad steigen: höhere Temperaturen sind bei dem Fehlen einer Kühlung des Apparates nicht zweckmäßig. Zur Verhinderung des bei dieser Temperatur sehr starken Schäumens gibt man einige Tropfen Oktylalkohol zu. Als Auffangeflüssigkeit werden ebenfalls 5 ccm n/50 Schwefelsäure in das Gefäß F eingefüllt. Die Titration wird ebenfalls mit Methylrot als Indikator ausgeführt.

Berechnung: 1 ccm für die Absorption des Ammoniaks verbrauchte n/50 Schwefelsäure entspricht 0,28 mg Stickstoff. Durch Multiplikation der Differenz zwischen vorgelegter Schwefelsäure und zum Zurücktitrieren verbrauchter Natronlauge mit 0,28 erhält man den gesamten Ammoniakstickstoff (präformiertes Ammoniak und Ammoniak aus Harnstoff) aus der angewandten Harnmenge. Die Menge des aus Harnstoff gebildeten Stickstoffs erhält man, wenn man von dem mit dieser Methode gefundenen Stickstoff die Menge des Stickstoffs des präformierten Ammoniaks abzieht. Beispiel: Wurden 5 ccm n/50 Schwefelsäure vorgelegt, 3 ccm Natronlauge zum Zurücktitrieren verbraucht, so ist die gesamte Stickstoffmenge aus Ammoniak und Harnstoff in den angewandten 0,1 ccm Harn $2,0 \cdot 0,28 = 0,56$ mg N. 1 ccm Harn enthielt demnach 5,6 mg N, 100 ccm 0,560 g N aus Harnstoff und Ammoniak. Will man den Harnstoff-Stickstoff für sich haben, so muß man von dieser Zahl den Ammoniak-N abziehen. Nimmt man die Verhältnisse in dem für die Ammoniakbestimmung gegebenen Beispiele an, so waren hier 0,51 mg NH_3 bzw. 0,42 mg NH_3-N in 1 ccm Harn, also 0,042 g NH_3-N in 100 ccm enthalten. Durch Subtraktion erhält man $0,560 - 0,042 = 0,518$ g reinen Harnstoff-N in 100 ccm Harn. Da im Molekül des Harnstoffs

(60) 28 Teile N enthalten sind, erhält man aus der Harnstoff-N-Zahl die Menge des Harnstoffes durch Multiplikation mit $\frac{60}{28}$ oder durch Multiplikation mit 2,143. In dem Beispiele wäre also der Harnstoffgehalt 0,518 · 2,143 = 1,110 g in 100 ccm Harn.

Da die angewandten Reagentien, insbesondere das Sojabohnenmehl bzw. die Urease häufig etwas Ammoniak enthalten, ist mit den angewandten Materialien, wie in der Einleitung bereits angegeben, ein Vorversuch anzustellen und dessen Ergebnis bei der Analysenberechnung zu berücksichtigen.

Bestimmung des Harnstoffs allein.

Will man nur den Harnstoff allein, nicht zugleich mit dem Ammoniak bestimmen, so kann man aus dem zehnfach verdünnten Harn das Ammoniak entfernen und erhält dann in der NH_3-freien Lösung durch Behandlung mit Urease nur das aus Harnstoff stammende Ammoniak. Zu diesem Zweck bringt man in ein Reagensglas ca. 2 g fein gepulverten Permutit, gießt darauf 10—15 ccm des verdünnten Harns und schüttelt ca. 5 Minuten gut durch, wobei das präformierte Ammoniak vollständig vom Permutit absorbiert wird. Man filtriert und verfährt mit 1 ccm Filtrat genau wie oben angegeben.

Berechnung: 1 ccm verbrauchte n/50 H_2SO_4 entspricht 0,28 mg Harnstoff-N bzw. 0,60 mg Harnstoff. Wurden 5 ccm n/50 H_2SO_4 vorgelegt, 3,5 ccm n/50 NaOH zum Zurücktitrieren verbraucht, so ist der Gehalt an Harnstoff-N in 0,1 ccm (5,0—3,5) · 0,28 mg = 0,42 mg, der Gehalt an Harnstoff 1,5 · 0,6 = 0,90 mg, der Prozentgehalt also 0,42 bzw. 0,90 %.

Volumetrische Bestimmung des Harnstoffs.

Verfahren Ambard.

Die Methode beruht auf dem bekannten Prinzip der Freisetzung von Stickstoff mit Hilfe von Bromlauge. Die Methode ist nicht zu empfehlen. Ihre Aufnahme erfolgt nur, weil trotz ihrer geringen Genauigkeit manche Unter-

sucher, die nur Annäherungswerte brauchen, gern mit ihr arbeiten.

Benötigte Reagentien: 1. Bromlauge nach Treadwell. 10 g Natriumhydroxyd werden in Wasser gelöst, auf 125 ccm verdünnt, zu der mit Eis gekühlten Flasche 3 ccm Brom zugegeben und gemischt. Die Lösung muß in dunkler Flasche aufbewahrt werden, muß kalt stehen und hält sich auch unter diesen optimalen Bedingungen nur einige Tage. 2. Natronlauge 10%ig. 3. Alkoholische Phenolphthaleinlösung.

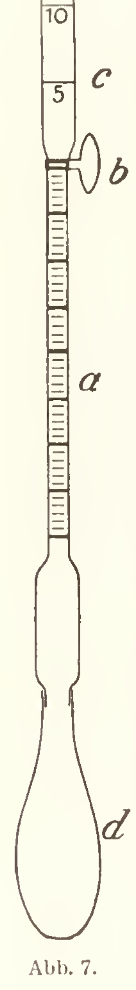


Abb. 7.

Für die Bestimmungen dient der in Abb. 7 dargestellte kleine Apparat. Er besteht aus einem graduierten Rohr a, das an seinem oberen Teil durch einen Hahn b von einem Rohrstück c abgeschlossen werden kann, das eine Graduierung für 5 und 10 ccm hat. Am unteren Ende hat das Rohr einen etwas weiteren Teil. Am Ende dieses wird eine Gummikappe d aufgesetzt, die eine Anzahl Glasperlen enthält. Der ganze Apparat wird in einem Stativ befestigt.

Nur Harne mit einem spezifischen Gewicht bis 1,005 werden unverdünnt angewandt. Bei einem spezifischen Gewicht von 1,005 bis 1,010 ist mit destilliertem Wasser auf das doppelte, bei einem spezifischen Gewicht von 1,010 bis 1,015 mit 2 Volumen Wasser, also auf das dreifache, zu verdünnen und so fort.

Durch wiederholtes festes Zusammendrücken der Gummikappe d treibt man unter gleichzeitiger Öffnung des Hahnes b die Luft aus dem Rohr möglichst vollständig heraus und verschließt dann durch den Hahn b die Verbindung zwischen c und a. Die Kappe d muß dann vollständig zusammengedrückt (luftleer) bleiben. Man bringt mit einer Pipette 1 ccm des Harnes bzw. der Verdünnung in das Aufsatzstück c, gibt 1 Tropfen Phenolphthalein und so viel Natronlauge dazu, daß deutliche alkalische Reaktion besteht, gibt bis fast zur Füllung des Teiles c destilliertes

Wasser dazu und öffnet nun den Hahn, worauf die Lösung in den jetzt luftleeren Teil a herabfließt. Ehe die Flüssigkeit den Hahn b vollständig passiert hat, wird dieser geschlossen, wieder in c Wasser gegeben, b wieder geöffnet und weiter Flüssigkeit hereingelassen, bis a mit seinem bauchigen Teile vollständig gefüllt ist. Es ist aber Sorge zu tragen, daß keine Luftblasen mit hereinkommen: ist dies doch der Fall, so ist durch wiederholtes Zusammendrücken der Kappe d unter gleichzeitiger Öffnung von b die Luft vollständig zu entfernen. Am Schluß dieser Manipulation muß der Teil a vollständig mit Flüssigkeit gefüllt sein und diese noch ein wenig über den Hahn b herausreichen. Die Kappe d, welche ja nicht gefüllt ist, muß nach wie vor luftleer, d. h. kollabiert sein. Man bringt nun in das Teil c 10 ccm Bromlauge (bis zur Marke), öffnet den Hahn b und läßt die Bromlauge hereinlaufen, ohne daß Luftblasen mitkommen. Kurz vor dem Abfließen der gesamten Menge wird b geschlossen, so daß einige Tropfen oberhalb des Hahnes stehen, Wasser in c hereingetan und wiederum geöffnet, bis der gesamte Apparat einschließlich der Kappe vollständig mit Flüssigkeit gefüllt ist. Man muß in c so viel Wasser nachgeben, daß dann noch etwas Wasser über b stehenbleibt. Man schließt nun b und mischt Bromlauge und Harnlösung durch wiederholtes Hin- und Herneigen, was durch die in der Kappe d befindlichen Glaskugeln erleichtert wird. Bei Aufrechtstellung des Apparates sammelt sich der freigemachte Stickstoff im oberen Teile an und drängt die Wassersäule nach unten. Man bringt nun den ganzen Apparat bis über den Hahn b hinaus in ein möglichst großes Glasbassin, dessen Wassertemperatur festgestellt sein muß, nimmt unter Wasser die Kappe d ab und stellt, nachdem der Apparat die Temperatur des Wassers angenommen hat, was in ungefähr 3 Minuten erreicht ist, an der Skala des Rohres a das ausgeschiedene Stickstoffvolumen fest.

Die Berechnung gestaltet sich sehr einfach, wenn man die dem Apparate beigegebenen Tabellen benutzt, die sofort die Menge des Harnstoffs unter Berücksichtigung von Temperatur und Luftdruck angeben. Anderenfalls muß

nach den bekannten Formeln reduziert werden. 1 g Harnstoff liefert bei 0 Grad und 760 mm 372 ccm N. Zur Berechnung des Gewichts des Harnstoffs in 100 ccm Harn (p) unter Berücksichtigung vom Barometerstand b, Temperatur des Wasserbades t und einer Tension des Wasserdampfes bei dieser Temperatur b' ergibt sich

$$p = \frac{100 \cdot v \cdot (b - b')}{760 \cdot 372 \cdot a \, (1 + 0{,}003665 \, t)},$$

wobei v das abgelesene Volumen, a die angewandte Harnmenge, unverdünnt 1 ccm, verdünnt 0,5 bzw. 0,33 usw. ccm bedeutet.

Die Methode ist zweifellos der anderen geschilderten in ihrer Genauigkeit unterlegen: für rein klinische Versuche wird sie jedoch in manchen Fällen genügen.

Es empfiehlt sich, mit einer genau hergestellten Harnstofflösung den Apparat im allgemeinen und jede neue Bromlauge im besonderen zu prüfen.

Bestimmung des Gesamtstickstoffs.

Mikrokjeldahlverfahren.

Die Apparatur hierfür ist prinzipiell die gleiche wie die für die Ammoniakbestimmung beschriebene. Jedoch ersetzt man das Gefäß A durch einen Mikrokjeldahlkolben von ca. 75 ccm Inhalt, benutzt auf jeden Fall einen Kjeldahlaufsatz, wie im Rohr e, und schaltet vor dem Auffangegefäß einen kurzen Kühler ein. Die Apparatur gewinnt dann das in beifolgender Abb. 8 angegebene Aussehen, das ohne weiteres verständlich ist.

Prinzip: Sämtlicher Stickstoff aus Eiweiß, Eiweißabbauprodukten und sonstigen organischen Stickstoffverbindungen (nicht aber von Säureverbindungen des Stickstoffs, wie Salpetersäure usw.!) wird durch Veraschen mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Katalysators (Cu-Salz) in Ammoniak umgewandelt, welches von der überschüssigen Schwefelsäure als Ammoniumsulfat gebunden wird. Durch Zusatz einer hinreichenden Menge Alkali wird das Ammoniak in Freiheit gesetzt und in eine titrierte Schwefelsäure herein-

destilliert. Durch Titration wird die Menge des übergegangenen Ammoniaks und daraus die Menge des Stickstoffs ermittelt.

Notwendige Reagentien: Konzentrierte Schwefelsäure, möglichst NH_3-frei, Kupfersulfatlösung 10%ig, Natronlauge, möglichst ammoniakfrei, 33%ig: zur Titration die bei der Ammoniakbestimmung angegebenen Reagentien.

Der Harn wird wie bei der Harnstoffbestimmung auf das 10fache verdünnt. 1 ccm der verdünnten Lösung wird mit einer Vollpipette in den Mikrokjeldahlkolben einpipettiert, hierzu 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure — am besten aus einer Tropfflasche: 1 ccm = 30 Tropfen — und 0,3 ccm Kupfersulfatlösung gegeben und die Mischung auf freier Flamme so lange erhitzt, bis die nach Verbrennung der Kohlenstoffpartikelchen anfänglich braune Färbung in eine hellgrüne bis weißliche übergegangen ist. Es ist zu vermeiden, unnötig längere Zeit bis zum Festwerden zu erhitzen, da unter diesen Umständen Ammoniak entweichen kann.

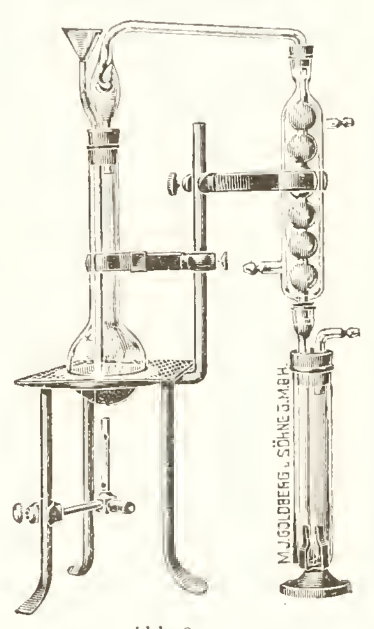


Abb. 8.

Nach fertiger Veraschung läßt man abkühlen und verdünnt mit 20 bis 25 ccm destilliertem Wasser, wobei die Färbung bläulich klar sein muß. (Die Veraschung kann, wenn ein Abzug nicht zur Verfügung ist, auch in einem offenen Raume vorgenommen werden, wenn man dafür sorgt, daß die Schwefelsäuredämpfe unschädlich gemacht werden. Man kann dies erreichen, wenn man auf den Hals des Kjeldahlkolbens einen Aufsatz aufsetzt, dessen anderes Ende in eine Wasserflasche mit Wasser taucht, während ein zweiter Weg aus dieser zur Luftpumpe führt, so daß die Dämpfe dauernd abgesaugt werden [1] [s. Abb. 9]). Für die Destillation wird das

[1] Bezugsquelle: M. J. Goldberg & Söhne, Charlottenburg 2.

Auffangegefäß wiederum mit 5 ccm n/50 Schwefelsäure beschickt. Nachdem der Apparat zusammengesetzt, die Wasserkühlung angestellt ist und alle Verbindungen auf ihre Dichtheit geprüft sind, saugt man wie bei der Ammoniakbestimmung einen schwachen Luftstrom durch den Apparat, gießt sodann durch den Trichter 4 ccm Natronlauge ein und steckt die Flamme unter dem Destillierkolben an. Auf Zusatz der Lauge muß die Flüssigkeit im Destillierkolben infolge Bildung von Kupferhydroxyd eine bläuliche Trübung geben; ist dies nicht der Fall, so ist noch etwas Lauge nachzugeben. Man verstärkt die Luftdurchsaugung und regelt die Flamme so, daß die Flüssigkeit (ein Wasserbad wird hier nicht angewendet) in regelmäßigem deutlichen Sieden bleibt: durch Ausscheidung von Kupferoxyd tritt in der Regel bald eine Schwarzfärbung ein. Man destilliert hier im ganzen 15 Minuten, in welcher Zeit sämtliches Ammoniak übergetrieben ist, achtet aber darauf, daß immer im Destillierkolben so viel Flüssigkeit bleibt, daß das Trichterrohr noch eintaucht.

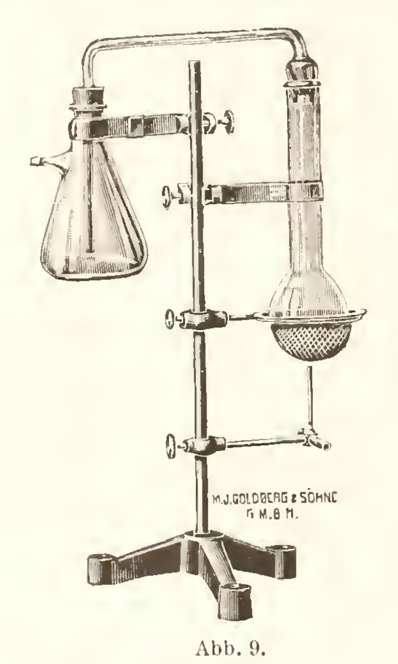


Abb. 9.

Nach Beendigung der Destillation verfährt man genau so, wie bei der Ammoniakbestimmung angegeben ist. Die durch Schwefelsäure gebundene Menge Ammoniak wird in üblicher Weise ermittelt; durch Multiplikation der Differenz zwischen der angewandten Schwefelsäure und der zum Zurücktitrieren verbrauchten Natronlauge mit 0,28 erhält man die Gesamtmenge mg N in den angewandten 0,1 ccm Harn bzw. die Anzahl g N in 100 ccm Harn.

Es muß nochmals wiederholt werden, daß regelmäßig L e e r b e s t i m m u n g e n auszuführen sind, bei welchen man in der ganz gleichen Weise verfährt wie bei den Vollbestimmungen, mit der einzigen Ausnahme, daß man die

betreffende Menge Harn durch eine entsprechende Menge destilliertes Wasser ersetzt. Alle Versuchsbedingungen sind bei diesen Kontrollen, die mindestens so oft anzustellen sind, als neue Reagentien angebrochen werden, innezuhalten, und der hierbei ermittelte Ammoniakgehalt der Reagentien bei der Ausrechnung in Abzug zu bringen. Peinlich ist darauf zu achten, daß in dem Versuchsraum keine Ammoniakdämpfe vorhanden sind.

Ich empfehle für sämtliche Ammoniakbestimmungen die titrimetrische Methode, da diese die zuverlässigsten und von persönlichen Beobachtungsfehlern reinsten Resultate gibt. In amerikanischen Laboratorien wird vielfach statt der titrimetrischen Ammoniakbestimmung die kolorimetrische verwandt, indem durch Zugabe von Neßlers Reagens zu der Ammoniaklösung eine Gelbfärbung erzeugt wird, welche mit der einer ebenso behandelten Ammoniaklösung bekannten Gehaltes verglichen wird. Das Verfahren ist folgendes:

Herstellung von Neßlers Reagens nach Folin und Wu: 150 g Jodkalium und 110 g Jod werden mit 100 ccm Wasser in eine starke Flasche von ungefähr 500 ccm eingefüllt, hierzu 150 g metallisches Quecksilber gegeben und 7—15 Minuten stark geschüttelt, bis die dunkle Färbung einer helleren Platz macht. Die heiße Lösung wird in fließendem Wasser abgekühlt und weiter geschüttelt, bis die Farbe grünlich geworden ist. Es wird darauf vom ungelösten Quecksilber abgegossen, mit viel destilliertem Wasser nachgewaschen und schließlich auf 2 l verdünnt. Aus dieser Stammlösung wird das eigentliche Reagens so hergestellt, daß 750 ccm der Stammlösung mit ebensoviel destilliertem Wasser und 3,5 l einer 10 %igen Na_2CO_3-freien Natronlauge gemischt werden. Die Lösung muß gut absetzen, damit sie klar wird.

Andererseits wird eine Ammoniaklösung bekannten Gehaltes so hergestellt, daß 4,721 g reines Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$ in einem Meßkolben in Wasser gelöst und die Lösung auf 1000 ccm aufgefüllt wird. Die gut durchgemischte Lösung enthält 1 mg Stickstoff in 1 ccm. Zur kolorimetrischen Bestimmung überführt man quantitativ in ein Meßkölbchen von 50 ccm den Inhalt des Auf-

fangegefäßes indem man dieses mit etwas Wasser nachwäscht, in das andere Meßkölbchen je nach der erwarteten Konzentration 1 ccm der Standard-Ammoniumsulfatlösung oder 1 ccm einer bestimmten Verdünnung derselben. Bei den Werten der bisher betrachteten Größenordnung wird es zweckmäßig sein, 1 ccm der Standardlösung oder einer Verdünnung 1:1 der Ammoniumsulfatlösung (entsprechend 0,5 mg N) anzuwenden. In beide Kölbchen gibt man so viel destilliertes Wasser, daß dieselben ungefähr zur Hälfte gefüllt sind, fügt dann zu jedem mit der Pipette 10 ccm der gebrauchsfertigen Neßlerschen Lösung zu, füllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf, mischt gut durch und schließt möglichst sofort die kolorimetrische Bestimmung an. Zu diesem Zwecke bringt man beim Dubosqschen Apparat in jeden Trog eine Lösung, bei den von Autenrieth gießt man die dunkler erscheinende Lösung in den Leerkeil, die weniger konzentrierte in den Trog. Bei den anderen Kolorimetern mit nur einer veränderlichen Schichtdicke verfährt man sinngemäß.

Berechnung: War die Vergleichslösung mit einem Gehalt von 0,5 mg N in 1 ccm in die Kuvette mit 20 mm Schichtdicke eingefüllt, die Versuchslösung in den Trog, und war ihre Schichtdicke bei Farbengleichheit als Mittel aus mehreren Versuchen zu 26 mm gefunden worden, so ergibt sich nach der im allgemeinen Teil entwickelten Formel die Konzentration der Versuchslösung

$$c = 0{,}5 \cdot \frac{20}{26} = 0{,}385 \text{ mg N}$$

in der angewandten Harnmenge. Will man den Ammoniakwert ermitteln, muß man diesen Wert naturgemäß mit $\frac{17}{14}$ multiplizieren.

Ich habe, wenn ich auch die kolorimetrische Methode für die Ammoniakbestimmung nicht als zweckmäßig erachte, die Vorschrift mitgeteilt: die Resultate sind im übrigen gute und mit der titrimetrischen Methode prinzipiell übereinstimmende, falls nicht durch irgendwelche, zum Teil unerklärliche Nebenumstände Trübungen

der Lösung auftreten, welche einen kolorimetrischen Vergleich verbieten. Diese Fehler sind besonders häufig bei den von amerikanischer Seite (besonders Folin) mitgeteilten Verfahren, einen kolorimetrischen Vergleich direkt in der Veraschungsflüssigkeit des Mikrokjeldahl nach Zusatz von Neßlers Reagens auszuführen oder im Harn nach geringer Vorbehandlung mit Tierkohle oder dergleichen mit Neßlerschem Reagens eine Färbung zu erzeugen und auf Grund dieser direkt kolorimetrisch die Menge Ammoniak zu ermitteln (direkte Neßlerisation). Es gelingt wohl in einzelnen Fällen, mit diesen Verfahren, welche ja außerordentlich viel Zeit und Arbeit ersparen würden, brauchbare Ergebnisse zu erhalten, ich möchte sie jedoch vor der Hand noch nicht als allgemeine Methode empfehlen.

Bestimmung der Aminosäuren.

Prinzip: Es wird mit Naphthochinonsulfosäure eine Färbung erzeugt, welche kolorimetrisch mit einer solchen verglichen wird, welche eine Aminosäurelösung bekannten Gehaltes ergibt.

Gebrauchte Reagentien: 1. Lsg. von Na-Carbonat krist. 2,5%ig, 2. Glykokoll-Vergleichslösung, enthaltend 0,1 mg N im ccm. Hierzu werden 0,0536 g Glykokoll in 100 ccm n/10 HCl gelöst. 3. n/10 HCl, 4. Reagenslösung: 100 mg Naphthochinonsulfosäure (Darstellung S. 51) werden in 20 ccm Wasser gelöst. Stets frisch zu bereiten! 5. Permutit, gepulvert. 6. Essigsäureazetatlösung: 100 ccm 50%ige Essigsäure werden mit 100 ccm 5%iger Natriumazetatlösung vermischt. 7. Natriumthiosulfatlösung, 4%ig.

Der Harn wird mit der gleichen Menge Wasser (bei sehr starken Konzentrationen mit der doppelten Menge) verdünnt und ungefähr 10 ccm dieser Verdünnung in einem Reagensglas mit 1—2 g Permutit zur Entfernung des Ammoniaks ungefähr 5 Minuten durchgeschüttelt, absetzen gelassen und klar filtriert. Es werden nunmehr in Röhrchen mit einer Marke bei 25 eine Probe des so behandelten Harnes und eine Kontrollprobe angesetzt und zwar erfolgt der Ansatz nach folgender Aufstellung.

	Harnprobe	Kontrollprobe
Glykokollösung (2)	—	3 ccm
Harnverdünnung	5 ccm	—
n/10 HCl	1 „	—
Natriumkarbonatlösung (1)	1 „	3 „
Wasser	3 „	4 „
Chinonreagens (4)	5 „	5 „

Die Proben werden 18—24 Stunden an einer dunklen Stelle aufbewahrt. Nach dieser Zeit werden sie herausgenommen und in der angegebenen Reihenfolge die nachfolgenden Reagentien zugefügt:

	Zur Harnprobe	Zur Kontrollprobe
Essigsäure-Azetatlösung (6)	1 ccm	1 ccm
Thiosulfatlösung (7)	5 „	5 „
Wasser	bis 25 „	bis 25 „

Es wird gut durchgemischt und der kolorimetrische Vergleich vorgenommen, zweckmäßig unter Anwendung eines Farbglases.

Die Menge des Aminostickstoffs im Harn berechnet sich nach der bekannten Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$, wobei c_1 die Menge des Aminostickstoffs in der Kontrolle, (0,3 mg), s_1 und s die Kolorimeterablesungen der Kontrollösung bzw. der Harnprobe bedeuten. Diese Zahl ist noch mit der Harnverdünnung zu multiplizieren.

Beispiel: Es sei der Harn auf das doppelte verdünnt gewesen, die Ablesungen am Kolorimeter seien bei Farbengleichheit für die Kontrollösung $s_1 = 30$, für die Versuchslösung $(s) = 20$. Da zum Vergleich eine Glykokolllösung mit 0,3 mg N angewandt war, ergibt sich die Konzentration in den angewandten 5 ccm verdünnten Harnes zu $0{,}3 \cdot \frac{30}{20}$ mg = 0,45 mg Amino-N in 5 ccm verdünntem Harn. Da die Harnverdünnung das Doppelte betrug, ist dies der Gehalt von 2,5 ccm unverdünntem Harn. Die Menge von Amino-N in 100 ccm wird also durch Multiplikation mit 40 ermittelt und ergibt sich demnach zu 18 mg Amino-N in 100 ccm des unverdünnten Harns.

Darstellung des β-naphthochinonsulfosauren Natriums
(nach Folin & Wu).

Zur Darstellung von ungefähr 40 g der reinen Substanz sind folgende Reagentien erforderlich:

500 ccm 10%ige Schwefelsäure,
50 „ Salpetersäure konzentriert
250 „ Salzsäure konzentriert 1,19
150 „ Natronlauge 10%ig
1000 „ Natriumchloridlösung 10%ig
0,5 „ Brom
25 g Natriumnitrit
50 „ Natriumnitrat
25 „ Natriumsulfit (Na_2SO_3)
50 „ Natriumbisulfit ($NaHSO_3$)
200 „ Borax
50 „ β-Naphthol, resublimiert
1000 ccm Alkohol
100 „ Äther.

Das Verfahren gestaltet sich wie folgt.

50 g β-Naphthol werden in einen Kolben von ungefähr ½—¾ l eingebracht, dazu 150 ccm 10%ige Natronlauge gegeben und verrührt, bis vollständige Lösung erfolgt ist (ungefähr 15 Minuten). Andererseits werden 25 g Natriumnitrit in einem 2-Liter-Kolben eingebracht, 300 ccm destilliertes Wasser zugefügt und geschüttelt, bis alles gelöst ist (3—5 Minuten). Nunmehr wird die Naphthollösung in den Kolben mit der Nitritlösung hereingegossen und mit ungefähr 50 ccm Wasser nachgespült.

Es wird nun zur Mischung ungefähr 400 g zerkleinertes Eis zugefügt und nun unter Rühren kalte, 10%ige Schwefelsäure zugegeben. Diese Manipulation wird so ausgeführt, daß zunächst 100 ccm langsam so herein gegeben werden, daß man sie an der Seitenwand des Glases herunterlaugen läßt und dabei stark rührt, was ca. 2 Minuten in Anspruch nimmt, und nach vollendeter Zugabe noch 2 Minuten weiter rührt. Man wiederholt die Manipulation in gleicher Weise noch 3 mal, worauf die Reaktion deutlich und dauernd gegen Kongopapier

sauer sein muß. Ist dies nicht der Fall, so wird weiter Schwefelsäure bis zur Erreichung dieses Zustandes zugefügt. Während dieses ganzen Prozesses entsteht ein gelber Niederschlag mit leicht grünlicher Färbung, der sich schließlich so verdichtet, daß man eine halbfeste Paste erhält. Man läßt diese eine Stunde stehen, saugt dann durch eine ziemlich große Nutsche (von ungefähr 12 cm Durchmesser) den Niederschlag ab und wäscht mit $^{3}/_{4}$ l kaltem Wasser nach.

Man bringt nun den erhaltenen Niederschlag von Nitroso-β-Naphthol in eine große Porzellanschale und streut darüber 50 g Natriumbisulfit und 25 g Natriumsulfit und rührt mit einem Glaslöffel gut um, wodurch der Niederschlag sich verflüssigt. Man filtriert sehr schnell durch einen Buchnertrichter und eine Saugflasche, wobei ein geringer schwarzer Rückstand bleibt, und wäscht mit wenig Wasser nach.

Das Filtrat einschließlich Waschwasser überführt man sofort in eine dunkle weithalsige $2^{1}/_{2}$—3 Liter-Flasche, welche bereits 1 l Wasser und 250 ccm konzentrierte Salzsäure enthielt. Man läßt, mit einem Uhrglas bedeckt, im Dunkeln 36 Stunden stehen, wobei sich ein Netzwerk von weißen Nadeln ausscheidet. Belichtung erzeugt gefärbte Zersetzungsprodukte. Man filtriert durch einen Buchnertrichter von 15 cm Durchmesser ab und wäscht den Niederschlag, welcher 1-Amino- 2-Naphthol- 4-Sulfonsäure ist, auf der Nutsche mit 1 l kaltem Wasser nach.

Hierauf bringt man die Verbindung, nachdem man sie zunächst mit einem Spatel von dem Buchnertrichter auf ein großes Blatt Filtrierpapier überführt hat, in einen weithalsigen Erlenmeyerkolben von 2 l Fassungsraum, streut 50 g Natriumnitrat darüber, mischt in einem anderen Gefäß 50 ccm Salpetersäure mit 175 ccm Wasser und fügt diese Mischung noch warm dem Inhalt des Erlenmeyerkolbens hinzu. Man läßt 10 Minuten stehen, während sich nitrose Dämpfe entwickeln, rührt danach einige Minuten gut um und läßt wiederum $^{1}/_{2}$ Stunde stehen. Wenn keine Reaktion eingetreten ist, was z. B. durch Verunreinigung des Nitrates durch Karbonat be-

dingt sein kann, setzt man noch 1—2 ccm konzentrierte Salpetersäure zu. Nach $^1/_2$ Stunde wird der Niederschlag mit Hilfe der Saugflasche und eines kleinen Buchnertrichters von ungefähr 10 cm Durchmesser abgesaugt und mit 500 ccm $10^0/_0$iger Kochsalzlösung nachgewaschen. Das auf diese Weise erhaltene Natriumsalz der 1-2-4-Naphthochinonsulfosäure muß nun noch gereinigt werden.

Hierzu wird der feuchte Niederschlag aus dem Buchnertrichter in eine große Porzellanschale überführt, 100 g gepulverter Borax zugegeben und nach Zufügung von ungefähr 230 ccm Wasser die Masse mit einem Pistill so lange verrieben, bis das ganze Chinon, abgesehen von einigen Flocken, gelöst ist. Mit der Saugpumpe wird dann vom überflüssigen Borax und dem ungelösten gefärbten Rückstand unter geringer Saugung abfiltriert und mit ungefähr 75 ccm Wasser nachgewaschen. Inzwischen werden 425 ccm $95^0/_0$iger Alkohol mit 75 ccm konzentrierter Salzsäure in einen Jenaer Kolben eingebracht und der Inhalt unter der Wasserleitung gut abgekühlt. Andererseits wird das chinon- und boraxhaltige Filtrat in ein Becherglas von ungefähr 2 l gebracht: zu der Salzsäure-Alkohollösung werden einige Tropfen Brom zugesetzt und die nach Auflösung dieses erhaltene strohgelbe Lösung in das Becherglas hereingegeben und einige Male kräftig umgerührt, so daß eine gute Mischung erfolgt. Der nach 5 Minuten langem Stehen gebildete Chinonniederschlag wird mit der Saugflasche und einem Buchnertrichter abfiltriert und mit ca. 400 ccm der $10^0/_0$igen Kochsalzlösung nachgewaschen. Es wird nunmehr dieses ganze letztere Verfahren der Umkristallisation in gleicher Weise wiederholt, doch wird der Chinonniederschlag auf der Nutsche dieses Mal nicht mit Kochsalzlösung ausgewaschen, sondern zuerst mit ungefähr 200 ccm $95^0/_0$igem Alkohol und darauf mit 100 ccm Äther. Die auf diese Weise getrocknete Substanz wird in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Als Kontrollen der Brauchbarkeit sind folgende Proben auszuführen:

1. Eine $1^0/_0$ige Lösung des Präparates in Wasser soll verglichen mit einer 0,5 Normallösung von Kalium-

bichromat bei Farbengleichheit eine Schichtdicke von 26—27 gegenüber der des Kaliumbichromats von 20 zeigen.

2. Wenn 2 ccm einer 1%igen Lösung auf 25 ccm verdünnt werden, und dazu 1 ccm 25%ige Essigsäure und 1 ccm 15%ige Thiosulfatlösung gesetzt werden, soll die Lösung in wenigen Sekunden fast farblos werden.

3. Zur Probe auf Abwesenheit von Ammoniak werden 10 ccm der 1%igen Chinonlösung mit ungefähr 2—3 g Permutit 3—4 Minuten geschüttelt. Man gießt ab und wäscht den Permutit 4—5 mal mit destilliertem Wasser aus, bis die Waschflüssigkeit ganz farblos ist. Setzt man nun zum Permutitrückstand einige Tropfen 10%ige Natronlauge, 5 ccm Wasser und 5 ccm Neßlers Reagens, so darf keine Gelbfärbung auftreten.

Bestimmung des Zuckers (Mikro-Pavy).

Prinzip: Nach Pavy wird Kupfersalz in alkalischer Lösung durch Traubenzucker reduziert, das gebildete Kupferoxydul in Lösung gehalten. Der Endpunkt der Reaktion ist durch die Entfärbung der blauen Kupferlösung gekennzeichnet.

Gebrauchte Reagentien: 1. Seignettesalzlösung, 20,4 g reinstes Seignettesalz, 20,4 g reines Kaliumhydrat werden in wenig Wasser gelöst, 300 ccm 35%ige Ammoniaklösung (spezifisches Gewicht 0,88) zugegeben und das ganze auf 1000 ccm aufgefüllt. 2. Kupfersulfatlösung, 4,158 g kristallisiertes reinstes Kupfersulfat werden mit destilliertem Wasser im Meßkolben zu 1000 ccm gelöst. 3. Ammoniaklösung 35%ig (spezifisches Gewicht 0,88).

Der für die Methode erforderliche Apparat (Abb. 10) besteht aus einem Erlenmeyerkölbchen aus Jenaer Glas von ungefähr 75 ccm Fassungsraum A, der mit einem doppelt durchbohrten Stopfen armiert ist. Durch dessen eine Öffnung geht das Ansatzstück einer Mikrobürette B, welche eine Teilung bis 5 ccm trägt, und aus dem Bassin des Nebenrohres stets wieder aufgefüllt werden kann (die Mikrobürette entspricht der auch sonst von mir angegebenen mit der einen Ausnahme, daß der Fassungsraum ein größerer ist). Durch die andere Bohrung des

Korkens geht ein seitliches Rohr, welches zu einem mit Bimsteinstückchen gefüllten U-Rohr C führt, die mit Schwefelsäure getränkt sind. Die ganze Apparatur ist an einem Stativ befestigt, welches außerdem unter dem mit einem Drahtnetz verkleideten Ring, auf welchem der Kolben A steht, einen Mikrobrenner B trägt.

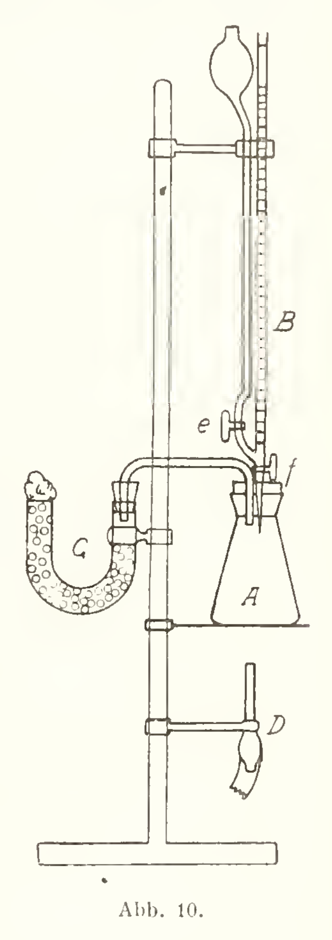


Abb. 10.

Zum Versuch muß der Harn verdünnt werden, und zwar sind Harne (eiweißhaltiger Harn ist zu enteiweißen) mit einem spezifischen Gewicht unter 1015 10mal, solche bis 1025 auf das 25fache, solche mit einem noch höheren auf das 50fache zu verdünnen, indem 5 bzw. 2,5 bzw. 1 ccm im Meßkolben mit Wasser auf 50 aufgefüllt wird. Nachdem der Stopfen mit den beiden darin montierten Teilen, Mikrobürette und U-Rohr abgenommen worden ist, wird verdünnter Harn in das Bassin der Mikrobürette B eingefüllt, wobei die Hähne e und f zunächst geschlossen bleiben; man öffnet dann e, so daß der Harn in das graduierte Bürettenrohr überfließt, schließt dann e wieder und läßt durch f so viel Harn fortfließen, daß alle Luftblasen entfernt sind: so bald das Bürettenrohr bis zur Spitze gefüllt ist, wird der Hahn f wieder geschlossen und durch Öffnen von e aus dem Behälter neuer Harn zugefügt, bis zur Marke o der Mikrobürette. Das Bassin sowie auch der zu ihm führende Schenkel muß dabei luftblasenfrei gefüllt sein. Man bringt nun in das Kölbchen A je 10 ccm Lösung (1) und (2), dazu 6 ccm (mit einem Meßzylinder abgemessen) Ammoniaklösung (3), gibt einige Glasperlen herein, setzt den Stopfen fest auf und erhitzt mit dem Mikrobrenner zum Sieden. Sobald das Sieden beginnt, stellt man die Flamme so ein, daß die Lösung ganz schwach kocht

und gibt nun durch Öffnen des Hahnes f im langsamen ständigen Strome (das Auslaufen der 5 ccm in der Bürette soll ungefähr 1 Minute dauern) so lange Harnlösung dazu, bis die anfangs blaue Lösung entfärbt ist. Ist dies mit den ersten 5 ccm nicht erreicht, so gibt man aus dem Reservoir durch Öffnen des Hahnes e neue Lösung in das Bürettenrohr bis zur Marke o und fährt damit fort, bis die Entfärbung erreicht ist.

Die Berechnung der Zuckermenge gründet sich darauf, daß zur vollständigen Reduktion der eingebrachten alkalischen Kupferlösung 0,005 g Traubenzucker erforderlich sind. Die hierfür gebrauchte Menge Harnverdünnung enthielt also 0,005 g Traubenzucker.

Beispiel: Der Harn sei auf das 25fache verdünnt worden. Zur Entfärbung waren 6,4 ccm Harnlösung erforderlich. Es gilt also die Gleichung $6{,}4 : 0{,}005 = 100 : x$. Die Menge des in 100 ccm Verdünnung enthaltenen Traubenzuckers betrug also $\frac{0{,}005 \cdot 100}{6{,}4} = 0{,}0781$ g oder 0,0781%. Da der Harn auf das 25 verdünnt war, ist der Prozentgehalt 0,0781 mal 25 = 1,95%.

Wie alle Reduktionsproben, bestimmt auch diese außer dem Zucker gewisse andere reduzierende Bestandteile: will man diesen Fehler eliminieren, so ist aus dem auf diese Weise ermittelten Zuckergehalt in der 24stündigen Harnmenge 2 g abzuziehen.

Bestimmung des Azetons, der Azetessigsäure und der β-Oxybuttersäure.

Azeton (präformiertes) wird in der Kälte, Azeton aus Azetessigsäure in der Wärme unter Säurezusatz mit Hilfe eines Luftstromes ausgetrieben. Als Maß der Azetonmenge dient die Jodoformbildung.

Notwendige Reagentien: 1. Oxalsäurelösung, 1%ig; 2. Essigsäure, 10%ig; 3. Natronlauge, 15%ig; 4. Salzsäure, konzentriert; 5. $^1/_{100}$ n-Jodlösung; 6. $^1/_{100}$ n-Thiosulfatlösung; 7. 1%ige Stärkelösung.

Zur Bestimmung dient folgender Apparat: (Abb. 11). Als Destillierkolben dient ein Fraktionierkölbchen von ca. 125 ccm Inhalt mit langem Hals, der oben einen einge-

schliffenen Stopfen mit fast bis zum Boden reichenden, oben zu einem Trichter erweiterten Rohr trägt, als Auffanggefäß eine sogenannte Gaswaschflasche mit eingeschliffenem Stopfen. Verbindungen mit dem zwischengeschalteten Kühler Glas an Glas. Man gibt in das Destilliergefäß A 2 ccm Harn, 25 ccm destilliertes Wasser

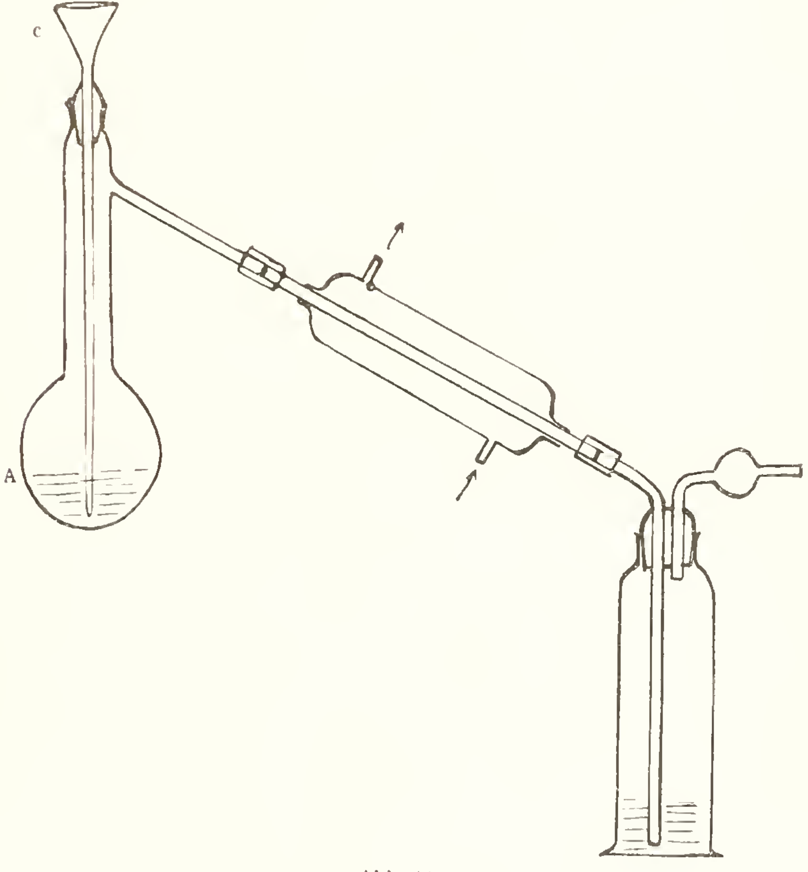


Abb. 11.

2 ccm Oxalsäurelösung und einige Tropfen Vaselinöl, in die Vorlage 10 ccm n/100 Jodlösung, 5 ccm Natronlauge und ca. 5 ccm destilliertes Wasser. Infolge der Flüchtigkeit des zu bestimmenden Körpers ist es besonders für genauere Untersuchungen sehr zweckmäßig, eine zweite Vorlage (Gaswaschflasche) hinter der ersten — ebenfalls mit kurzem Gummischlauch Glas an Glas — einzuschal-

ten. Diese wird mit 3 ccm n/100 Jodlösung, 1 ccm Natronlauge und ca. 5 ccm Wasser beschickt. Nach beendeter Destillation wird ihr Inhalt sofort zu dem der ersten Vorlage zugefügt, sodaß die weitere Verarbeitung gemeinsam erfolgt. Ist sehr viel Azeton zu erwarten, ist die Menge der Jodlösung (stets aus einer Bürette oder mit einer genauen Pipette zu entnehmen!) und der Lauge zu erhöhen. Ohne zu erwärmen, saugt man während 25 Minuten einen langsamen Luftstrom durch das System. Dann werden die Vorlagen abgenommen und durch neue in gleicher Weise beschickte ersetzt. In das Destilliergefäß gibt man durch den Trichter c 1 ccm Essigsäure und saugt nun 15 Minuten lang unter Erhitzen des Destillationsgefäßes auf freier Flamme weiter Luft durch. Verdampftes Wasser wird durch Zugießen von destilliertem Wasser durch den Trichter ersetzt. Die Vorlagen werden sofort nach ihrer Abnahme weiter verarbeitet. Man gibt so viel konzentrierte Salzsäure hinzu, daß die Lösung sich durch Ausscheidung von Jod bräunlich färbt, was mit dem Eintreten einer sauren Reaktion zusammenfällt. Tritt diese Braunfärbung nicht auf, so war zu wenig Jodlösung vorgelegt und die Bestimmung ist mit einer größeren Menge Jodlösung zu wiederholen. Man kann auch versuchen, durch Zusatz einer weiteren Menge Jodlösung die Analyse zu retten. Den Inhalt der Vorlage titriert man aus einer in $^1/_{50}$ ccm geteilten Mikrobürette unter Zusatz von Stärkelösung mit n/100 Thiosulfat, bis die Blaufärbung gerade verschwunden und die Lösung farblos geworden ist (Methodik vgl. auch z. B. bei N-Bestimmung im Blut nach Bang S. 90). Da die Reagentien jodbindende Stoffe enthalten können, ist ein Leerversuch anzustellen in genau gleicher Weise wie der Vollversuch mit der einen Abänderung, daß in den Kolben A statt Harn nur Wasser eingefüllt wird; ein eventuell dabei erhaltener Wert ist von dem beim Vollversuch gefundenen in Abzug zu bringen.

B e r e c h n u n g: Die Differenz zwischen der vorgelegten Menge Jodlösung und der zum Zurücktitrieren verbrauchten Menge Thiosulfatlösung in Kubikzentimeter, multipliziert

mit 0,0967, ergibt die Milligramme Azeton in der angewandten Harnmenge: die Titration der ersten Vorlage des präformierten Azetons, die der zweiten des Azetons aus Acetessigsäure.

Beispiel: Für präformiertes Azeton vorgelegt 13 ccm Jodlösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 12,2 ccm Thiosulfatlösung; Menge des präformierten Azetons $0{,}8 \cdot 0{,}0967 = 0{,}0774$ mg in 2 ccm, in 100 ccm also 3,87 mg. Für Azetessigsäure vorgelegt 13 ccm Jodlösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 9 ccm Thiosulfatlösung; Azetonmenge aus Azetessigsäure also $0{,}0967 \cdot 4 = 0{,}387$ mg in 2 ccm bzw. 19,3 mg in 100 ccm Harn.

Will man Azeton und Azetessigsäure nicht gesondert bestimmen, so verfährt man sofort, wie zur Bestimmung des Azetons aus Azetessigsäure angegeben, und erhält dann das präformierte und aus das Azetessigsäure gebildete Azeton zusammen.

Will man auch die β-Oxybuttersäure — durch Oxydation zu Azeton — bestimmen, so muß der Harn vorbehandelt werden. Man gibt in ein Meßkölbchen von 50 ccm genau 5 ccm Harn, dazu einen Überschuß — es darf auf weiteren Zusatz keine Fällung mehr entstehen — von Bleiessig (im allgemeinen genügen 5 ccm) und 1 ccm konz. NH_3, füllt zur Marke auf, mischt, filtriert und verwendet 20 ccm (= 2 ccm Harn) zur Azetonanalyse in der eben beschriebenen Art. Man säuert mit wenig Essigsäure an. Nach Austreibung des freien und des als Azetessigsäure vorhandenen Azetons, wie vorher beschrieben, läßt man abkühlen, gibt in das Destillationsgefäß so viel Wasser, daß die Menge ca. 30 ccm beträgt, und 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure. Nach Verbindung mit den mit Jod und Natronlauge, wie oben beschrieben, beschickten Vorlagen erhitzt man auf kleiner Flamme unter Luftdurchsaugung zum Sieden und gibt durch den Trichter c in Zwischenräumen von 5 Minuten viermal 5 ccm einer 2%igen Kaliumbichromatlösung. Nach 20 Minuten ist die Destillation vollendet, und man verfährt mit Ansäuerung und Titration in der oben beschriebenen Weise.

Die Berechnung des Azetons erfolgt wie geschildert.

Zur Feststellung der Menge der β-Oxybuttersäure multipliziert man die Differenz zwischen Jodlösung und Thiosulfat (ccm) mit 0,159 und erhält so die Milligramm Oxybuttersäure in der angewandten Harnmenge.

Bestimmung der Harnsäure in mittleren Harnmengen.

Notwendige Reagentien: 1. Uranammonsulfatlösung: 500 g Ammonsulfat werden in ungefähr 600 ccm Wasser gelöst und in einen Meßkolben von 1 l eingefüllt. Hierzu wird eine Lösung von 5 g Uranazetat in ca. 100 ccm Wasser und 6 ccm konzentrierte Essigsäure gefügt und die Mischung mit Wasser auf 1 l aufgefüllt; 2. Ammonsulfatlösung 10%; 3. konzentrierte Schwefelsäure; 4. Ammoniak, 25%ig; 5. Kaliumpermanganatlösung, $^1/_{50}$ normal.

60 ccm Harn werden in einem hohen Zylinder mit 15 ccm Uranreagens versetzt, gut durchgemischt und stehengelassen, bis der Niederschlag sich ziemlich gut abgesetzt hat. Man filtriert dann die klare Lösung durch ein trockenes Filter in ein trocknes Gefäß. In zwei große Zentrifugengläser von je ca. 30 ccm Fassungsraum pipettiert man je 25 ccm der klaren Lösung herein, gibt 2 ccm Ammoniak dazu, verschließt durch einen Stopfen und läßt mindestens über Nacht stehen, bis das ausgeschiedene Ammonurat sich etwas gesetzt hat. Man zentrifugiert dann scharf und gießt die klare überstehende Lösung ab. Man setzt je 15 bis 20 ccm Ammonsulfatlösung zu und zentrifugiert wieder, so daß der Niederschlag von Ammonurat sich gut am Boden absetzt. Die überstehende Flüssigkeit wird wieder abgegossen, und nunmehr im Rückstand die Bestimmung vorgenommen. Man gibt zu diesem 15 ccm Wasser und 3 ccm konzentrierte Schwefelsäure, wobei die Flüssigkeit sich auf 60—70 Grad erwärmt. Man titriert sofort mit $^1/_{50}$ Normal-Permanganatlösung unter häufigem Umrühren mit einem dünnen Glasstäbchen, bis die gesamte Harnsäure oxydiert ist, was dadurch erkennbar wird, daß der nächste einfallende Tropfen Permanganat der Flüssigkeit eine rosa Färbung erteilt. Verschwindet diese innerhalb 10 Sekunden, so ist noch ein Tropfen nachzugeben, bis die Farbe 10 Sekunden lang bestehen bleibt. In beiden Proben muß das Resultat

das gleiche sein und höchstens um einen Teilstrich differieren.

Berechnung: Die Anzahl verbrauchter Kubikzentimeter Permanganatlösung multipliziert mit 1,5 ergibt die Anzahl Milligramm Harnsäure in den angewandten 25 ccm Lösung bzw. 20 ccm Harn. Durch Multiplikation mit 5 wird die Harnsäuremenge in 100 ccm Harn erhalten: dieser Zahl sind noch 3 mg Harnsäure zuzufügen, da diese in Wasser etwas löslich ist.

Beispiel: Verbraucht seien im Durchschnitt der 2 Proben 3,0 ccm n/50 Permanganatlösung. Die Harnsäure in 100 ccm beträgt demnach $3{,}0 \cdot 1{,}5 \cdot 5 = 22{,}5$ mg + 3 mg = 25,5 mg.

Bestimmung des Kreatinins und Kreatins.

Die durch Zugabe einer alkalischen Pikratlösung erzeugte Rotfärbung wird mit der Färbung einer Bichromatlösung, deren Farbtiefe bekannt ist und einer bekannten Kreatininmenge entspricht, verglichen[1]).

Erforderliche Reagentien: 1. Pikrinsäurelösung 1,2 % (gesättigt), 2. Natronlauge, 10 %ig, 3. ½ Normal - Kaliumbichromatlösung (25,54 g Kaliumbichromat werden auf 1 l gelöst).

Zur Kreatininbestimmung können sämtliche Harne verwandt werden. Bei Gegenwart von Azeton und Azetessigsäure ist der Harn zunächst zur Entfernung dieser Körper kurz aufzukochen.

1 ccm Harn wird in einen 50 ccm Meßkolben pipettiert, mit 1,5 ccm Pikrinsäurelösung und 0,5 ccm Natronlauge versetzt, umgeschüttelt, 5 Minuten stehengelassen, auf 50 ccm mit Wasser aufgefüllt und durchgemischt. Die so erhaltene Färbung wird in irgendeinem Kolorimeter mit der Bichromatlösung verglichen, welche sehr annähernd einem Gehalt von 1 mg Kreatinin in 50 ccm entspricht. Wird gleiche Farbtiefe bei gleicher Schichtdicke der Versuchs- und Vergleichslösung erreicht, so enthalten auch die 50 ccm der Vergleichslösung bzw. der 1 ccm in dieser enthaltene Harn 1 mg Kreatinin.

---

[1]) Der Vergleich mit einer Standard-Kreatininlösung (wie für Blut beschrieben) scheint mir für Harn keinen Vorteil zu bieten.

Ist bei gleicher Farbtiefe die Schichtdicke verschieden, so ist der Kreatiningehalt in

$$1 \text{ ccm Harn} = \frac{\text{Schichtdicke der Bichromatlösung}}{\text{Schichtdicke der Versuchslösung}} \cdot 1 \text{ mg.}$$

Beispiel: Die Schichtdicke der Bichromatlösung sei 20 mm, die der Versuchslösung 25 mm; der untersuchte Harn enthält also $\frac{20}{25} \cdot 1 \text{ mg} = 0{,}8 \text{ mg}$ im ccm, 0,8 g Kreatinin im Liter.

Zur Bestimmung des Gesamtkreatinins, d. h. des präformierten Kreatinins (s. oben) und des Kreatins, muß letzteres in Kreatinin übergeführt werden. Dies geschieht durch Erwärmen von 10 ccm Harn + 5 ccm n-HCl während 3 Stunden im Wasserbad von 80°. Nach dieser Zeit wird die Lösung quantitativ in ein Kölbchen von 20 ccm übergespült, mit n-NaOH neutralisiert und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 2 ccm (entsprechend 1 ccm Harn) zur Analyse verwendet, die genau ausgeführt wird, wie für das Kreatinin beschrieben. Die Berechnung gestaltet sich entsprechend. Die Differenz zwischen dem Werte für das Gesamtkreatinin und dem des präformierten ergibt die Menge des Kreatins, als Kreatinin berechnet. Will man sie als Kreatin ausdrücken, so muß die erhaltene Zahl mit 1,27 multipliziert werden.

Mikromethodik des Blutes.

Bei den Methoden zur Bestimmung der Blutbestandteile muß man unterscheiden zwischen Mikromethoden im engeren Sinne und solchen, bei welchen zwar nur verhältnismäßig geringe Mengen Blut erforderlich sind — besonders im Vergleich mit den früher benötigten —, die immerhin aber einige Kubikzentimeter erfordern. Die in diesen Fällen nötigen Blutmengen entnimmt man am besten in üblicher Weise aus der Armvene mit Hilfe einer Straußschen Kanüle oder noch besser mit einer Spritze. Will man die Bestimmung im Serum vornehmen, so läßt man das Blut sofort in ein steriles Zentrifugenglas einfließen, läßt gerinnen und zentrifugiert darauf. Das Absetzen

des Blutkuchens vor dem Zentrifugieren wird beschleunigt, wenn man das Glas mit dem Blut für ungefähr $^1/_2$ Stunde in den Brutschrank stellt.

Soll die Bestimmung im Vollblut oder im Plasma ausgeführt werden, so muß in der Regel, besonders wenn man die weitere Bearbeitung nicht sofort anschließt, ein gerinnungshemmender Stoff zugefügt werden. Das sonst für diese Zwecke am besten geeignete Hirudin ist teuer. Man verwendet dementsprechend im wesentlichen die kalkfällenden Substanzen. Am besten für die meisten Zwecke eignet sich Kaliumoxalat. Man pulvert es ganz fein und gibt in das absolut trockne Gefäß, welches das Blut aufnehmen soll, 20 mg Kaliumoxalat auf 10 ccm Blut. Da größere Mengen unter Umständen schädlich, kleinere ungenügend zur Gerinnungshemmung sind, ist die Blutmenge genau abzumessen: man entnimmt entweder mit einer graduierten Spritze und spritzt aus dieser schnell das Blut in das oxalathaltende Gefäß hinein, oder, wenn man direkt in dieses Glas aus der Ader einfließen läßt, markiert man am Gefäß die entsprechende Höhe. Nachdem das Blut zum Kaliumoxalat zugetan ist, schüttelt man wiederholt gut um, bis eine vollständige Mischung stattgefunden hat. Die Methode ist durchaus zuverlässig und hat außerdem den großen Vorteil, daß das Blutvolumen nicht verändert wird, also Umrechnungen irgendwelcher Art erspart werden. Für manche Fälle empfiehlt sich eine Ungerinnbarmachung durch Zusatz von Natriumzitrat. Man stellt sich eine 5%ige Zitratlösung her und gibt in das Auffangegefäß 1 ccm auf 9 ccm aufzunehmendes Blut. Gute Mischung ist auch hier erforderlich. Nötig ist natürlich, daß das Mischungsverhältnis ganz strikt innegehalten wird, da dieses zum Schluß für die Berechnung nötig ist. Endlich kann man auch (vgl. z. B. S. 83) das Blut ohne Zusatz aus der Spritze sofort in ein größeres Volumen destilliertes Wasser überführen, wobei unter Hämolyse das verdünnte Blut flüssig bleibt.

Zu bemerken ist, daß unter Umständen das Stauungsblut eine etwas andere Zusammensetzung hat als das Blut der peripheren Kapillaren. Das Blut soll stets vom nüchternen Patienten entnommen werden.

Die wahre Mikromethodik, d. h. das Verfahren, welches die Venenpunktion umgeht und nur mit einigen Tropfen Kapillarblut arbeitet, ist im wesentlichen durch den kürzlich verstorbenen physiologischen Chemiker Ivar Bang ausgearbeitet worden. Es besteht darin, daß einige Tropfen Blut, welche der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnommen werden, auf einem Blättchen saugenden Papieres aufgenommen werden; aus diesem Blättchen werden die zu bestimmenden Bestandteile durch geeignete Lösungsmittel herausgelöst und in der so erhaltenen Lösung die Analyse ausgeführt. Diese Löschpapierblättchen müssen verschiedene Bedingungen erfüllen: sie müssen scharf geschnitten sein, damit keine kleinen Fasern bei der Behandlung sich loslösen und so das Gewicht verändern können. Sie müssen eine genügende Saugfähigkeit besitzen, um einige Tropfen schnell vollständig aufzunehmen, und sie müssen endlich frei sein von solchen Substanzen, die im Blut bestimmt werden sollen. Durch die Handlungen können fertig präparierte Blättchen in geeigneter Größe (16 × 26 mm) bezogen werden. Man kann sie selbst herstellen, indem man weißes, gut saugendes, starkes Löschpapier in passender Größe schneidet, die Stückchen zur Entfernung von eiweißhaltigen und kohlenhydratähnlichen Substanzen mehrere Male mit ganz schwach angesäuertem Wasser und darauf mit reinem Wasser ein- bis zweimal auskocht und dann an der Luft auf sauberem Papier zum Trocknen ausbreitet. Für Fettbestimmungen ist eine Extraktion mit siedendem Äther oder Petroläther und Alkohol erforderlich. Die Wägung der Blättchen vor und nach der Beschickung mit Blut erfolgt auf der Mikrowage (s. S. 10). Es ist darauf zu achten, daß die Lochstanzung, welche zum Anhängen an das Häkchen der Torsionswage erforderlich ist, ganz scharf ist. Über Abmessung von Blut zur Mikrobestimmung siehe S. 66. u. a. a. O.

Das Blut kann aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnommen werden. Die betreffende Stelle wird, wenn nötig, mit Wasser und Seife, stets aber mit Alkohol und etwas Äther gereinigt: zweckmäßig ist eine leichte Hyperämisierung durch Abreiben mit einem mit Xylol ge-

tränkten Wattebausch. Bei Tieren entnimmt man das Blut auf die allgemein übliche Weise, z. B. bei Kaninchen aus der Ohrvene, nachdem man die Haare etwas abgerupft hat.

Der Einstich erfolgt in die gereinigte Hautstelle am besten mit Hilfe des Frankeschen Schneppers, den man so tief einstellt, daß er durch die Haut durchdringt. Den ersten entstehenden Tropfen wischt man mit Watte scharf ab und nimmt die Blutentnahme nun so vor, daß man erst einen großen Tropfen sich ausbilden läßt und dann zur Aufsaugung das Blättchen an die Peripherie des Tropfens heranbringt. Man wiederholt dieses, nachdem sich ein weiterer Tropfen ausgebildet hat, sorgt aber dafür, daß man diesen mit einem noch nicht getränkten Teile des Löschpapiers aufnimmt. Man wiederholt diese Manipulation im allgemeinen 3—4mal, bis der untere Teil des Blättchens, bis ungefähr zum ausgestanzten Loch, mit Blut durchtränkt ist; es dürfen jedoch erhebliche Mengen nicht auf der blutdurchsaugten Oberfläche stehen, da die Bildung dickerer Schichten die spätere Extraktion mit dem Lösungsmittel erschwert oder ganz unmöglich macht. Während die Wägung der leeren Blättchen, die man zweckmäßig auf ein kleines Gestell aufreiht, das man sich durch Aufstecken von Stecknadeln mit etwas untergelegtem Kork in irgendein senkrecht stehendes Brett herstellt, längere Zeit vor der Abnahme, am besten gleich in einer größeren Serie erfolgen kann, muß die Wägung der mit Blut beschickten Blättchen sehr schnell vorgenommen werden, da sonst infolge Wasserverdunstung falsche Resultate gewonnen werden. Aus demselben Grunde ist es auch nötig, daß die Blutaufsaugung möglichst schnell geschieht. Sollten die Tropfen zu langsam heraustreten, so kann entweder der Einstich nicht genügend sein; man macht in diesem Falle daneben einen zweiten, etwas tieferen Einstich oder aber — besonders wenn der Blutaustritt nachläßt — handelt es sich um Gerinnung bzw. Verstopfung; man wird durch kurzes, wiederholtes scharfes Abwischen mit einem Wattebausch, wodurch außerdem eine Hyperämie erzeugt wird, in den meisten Fällen ein reichlicheres Fließen erzielen. Keinesfalls darf man die betreffende

Stelle drücken oder quetschen, um den Eintritt von Gewebssaft zu vermeiden. Bei diesen Mikromethoden müssen in jedem Falle mindestens zwei Parallelbestimmungen ausgeführt werden. Ferner ist, mindestens an jedem Tage einmal, eine Leerbestimmung unter Verwendung eines unbeschickten Blättchens erforderlich.

Bangsche Methodik mit Abmessen des Blutes.

Man kann die Kosten der Anschaffung einer Wage für die Mikrobestimmung umgehen, wenn man bei sonst ganz gleichem Verfahren die Abwägung des Blutes durch eine Messung ersetzt. Zu diesem Zweck sind genau kalibrierte, in cmm geteilte Pipetten notwendig, die 0,1 ccm fassen. Die Kalibrierung erfolgt am einfachsten durch Aufziehen von Quecksilber bis zur Marke und Abwiegen des aus der Pipette (nach Abwischen alles außen anhaftenden Quecksilbers) wieder herausgeblasenen Quecksilbers auf einer genauen analytischen Wage. Das Gewicht dieses Quecksilbers dividiert durch dessen spezifisches Gewicht (13,56) gibt den Inhalt der Pipette in Kubikzentimeter Wasser und ungefähr auch Blut an. Man kann auch die Eichung in genügend genauer Weise so vornehmen, daß man, wie bei der üblichen Bangschen Bestimmung, ein Blättchen abwiegt, in die Pipette bis zur Marke Blut aufsaugt, dieses nach Abwischen außen anhaftenden Blutes auf das Blättchen heraufbläst und das Blättchen schnell wieder wiegt. Das Gewicht gibt direkt den Inhalt an. Man verfährt bei dieser Eichung genau so, wie unten für die Anstellung der Versuche beschrieben. Am besten ist es, wenn die Pipette genau 0,1 ccm bzw. 0,1 g Blut faßt und man sie vollständig mit Blut füllt, da dadurch die Rechnung erheblich vereinfacht wird. Wenn man nicht genügend Blut bekommt, kann man sich natürlich auch mit einer geringeren, genau abgelesenen Menge begnügen. Wichtig ist es, daß man dieselben Pipetten für alle Versuche verwendet, da in diesem Falle auch bei kleinen Eichungsfehlern die Werte gut vergleichbar sind.

Zur Blutentnahme verfährt man folgendermaßen. In die gereinigte Haut macht man in üblicher Weise einen Einstich mit dem Frankeschen Schnepper. Da die Ab-

nahme mit der Pipette auf einmal erfolgen muß, ist eine etwas größere Blutmenge erforderlich. Hierzu muß eine Gerinnung des Blutes verhindert werden, was man durch schnelles Arbeiten ohne Schwierigkeit erreicht. Ist eine genügend große Menge Blut ausgetreten, so führt man die Pipette in den Blutstropfen herein und saugt bis zur Marke Blut auf: entweder mit dem Mund oder mit einer kleinen Rekordspritze, deren Ansatz durch einen kurzen Schlauch mit dem oberen Ende der Pipette verbunden ist. Nach regelrechter Füllung nimmt man die Pipette aus dem Blutstropfen heraus und wischt außen anhaftendes Blut sorgfältig weg. Man beschickt nun das Blättchen mit dem Blut, indem man dieses tropfenweise so aufsaugen läßt, daß es möglichst sich auf die Oberfläche des Blättchens verteilt. Die letzten Reste muß man — selbstverständlich Pipetten, die bis zum Ende geeicht sind, vorausgesetzt — durch Ausblasen herausbringen und zum Schluß das an der Spitze noch haftende Blut auf dem Blättchen abstreichen. Auf diese Weise gelingt es, das Blut quantitativ — mit Ausnahme eines konstanten, an den Wandungen haftenden Restes — auf das Blättchen zu überführen. Die weitere Verarbeitung geschieht wie bei den gewogenen Blättchen.

Vor jedem Versuch müssen die Pipetten rein und trocken sein: die Reinigung erfolgt zunächst mit kaltem Wasser, darauf mit Alkohol, endlich mit Äther: nachdem man diesen herausgeblasen hat, entfernt man die Reste durch kurzes Durchziehen durch eine Flamme.

Bestimmung des Wassergehaltes.

Die im allgemeinen sehr schwierige Bestimmung des Wassergehaltes wird durch Anwendung des Bangschen Prinzips der Aufsaugung des Blutes auf Löschpapierblättchen erheblich erleichtert. Die Wägung mit der Torsionswage ist jedoch für diese Fälle ungeeignet: man muß die analytische Wage benutzen.

Ein passendes, ungefähr doppelt so großes Blättchen als für die gewöhnlichen Bestimmungen nach Bang verwendet wird, wird in ein Wägegläschen überführt, mit diesem, aber nicht aufgesetzten, sondern danebengelegten Deckel eine

Stunde bei 100 Grad im Trockenschrank getrocknet, der Deckel aufgesetzt, das Wägegläschen in einen Exsikkator gebracht und nach vollständigem Erkalten auf einer analytischen Wage gewogen. Man stellt das Wägegläschen dann geschlossen zur Hand, bereitet alles für die Blutentnahme vor, und wenn das Blut so reichlich austritt, daß die nötige Menge in kürzester Zeit aufgesaugt werden kann, bringt man das Blättchen aus dem kurz geöffneten Wägegläschen mit Hilfe einer Pinzette an die Bluttropfen heran, saugt auf, überführt das vollgesaugte Blättchen schnell in das Wägegläschen und setzt den Deckel wieder auf. Bei der Blutentnahme ist besonders darauf zu achten, daß keine dicke Blutschicht entsteht, sondern daß das Blut in gleichmäßiger, möglichst dünner Schicht eingesaugt wird. Man wägt Wägegläschen und Blättchen, notiert das Gewicht und bringt das Wägegläschen wieder in den Trockenschrank. Nachdem man den Deckel abgenommen hat, trocknet man eine Stunde lang, überführt wieder in den Exsikkator und wägt wieder. Man bringt Wägegläschen mit Inhalt nochmals in den Trockenschrank herein, trocknet wie oben nochmals eine Stunde lang und führt wiederum nach Erkalten die Wägung aus. Stimmte dieses Gewicht mit dem nach einmaligem Trocknen erhaltenen überein, so kann man in einfacher Weise nunmehr den Wassergehalt aus der Differenz der beiden Wägungen feststellen. Fand noch eine Gewichtsabnahme statt, so ist Trocknung und Wägung nochmals zu wiederholen, bis das Gewicht konstant geworden ist.

In dieser Weise ausgeführt, sind die Resultate des Verfahrens zuverlässige: es wird nochmals auf eine möglichst dünne Aufsaugung des Blutes hingewiesen.

Bestimmung der Chloride nach Bang.

Prinzip: Die Chloride werden durch Alkohol aus dem Blute extrahiert; in der alkoholischen Lösung wird das Chlor mit Silbernitratlösung unter Verwendung von Kaliumchromat als Indikator bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1. 92 %iger Alkohol (genau!); 2. $^1/_{100}$ Normal-Silbernitratlösung; 3. 7 %ige Lösung von Kaliumchromat.

Blutentnahme und Wägung der Blättchen erfolgt in der S. 64—66 beschriebenen Weise.

Die Blättchen werden noch feucht in trockene Reagensgläser überführt und sofort mit 92%igem Alkohol übergossen, so daß dieser ungefähr 1/2 cm über dem obersten Rand der Blättchen steht. Man verschließe die Gläschen mit Stopfen und läßt mindestens 5 Stunden extrahieren — war das Blut schon ganz angetrocknet, was in der Regel bei längerem als 5minutigem Stehen nach der Entnahme eintritt, so ist eine Extraktion von mindestens 24 Stunden erforderlich. Man gießt dann die Extraktionsflüssigkeit in ein kleines Wägegläschen oder Erlenmeyerkölbchen über, gibt zum Nachwaschen in das Reagensglas noch ca. 5—6 ccm Alkohol und vereinigt diesen nach 1stündigem Stehen mit der übrigen Lösung. Man gibt hierzu nun einen kleinen Tropfen des Indikators — größere Mengen Indikator sind zu vermeiden, da der Umschlag ungenauer wird — und titriert nun aus einer Mikrobürette mit der Silbernitratlösung unter ständigem Rühren mit einem dünnen Glasstäbchen, bis der Umschlag von gelb in hellbraun erfolgt. Zur besseren Erkennung des Umschlages stellt man das Gläschen auf eine weiße Platte. Wichtig ist gute Beleuchtung, am besten Tageslicht oder Gasglühlicht. Bei gelblichem Licht ist der Umschlagpunkt nicht zu erkennen.

Die Bestimmung läßt sich auch nach der Volhardschen Methode durchführen, indem man die Blutlösung mit einem Überschuß von 1/100 Silbernitratlösung versetzt, nachdem man sie vorher mit einem Tropfen Salpetersäure angesäuert und einen Tropfen einer kaltgesättigten Lösung von Eisenammoniakalaun zugegeben hat, und das überschüssige Silber mit n/100 Rhodanammoniumlösung zurücktitriert, bis eine Rotfärbung auftritt. Die Ergebnisse sind ganz gleichwertig, die Bestimmung ist etwas komplizierter, da man zwei Normallösungen braucht, die natürlich aufeinander eingestellt sein müssen; andererseits wird der Umschlag von farblos nach rot von manchen Augen besser wahrgenommen als der von gelb nach hellbraun.

Die Berechnung ist begründet auf der bekannten Tatsache, daß 1 ccm n/100 Silbernitratlösung 0,355 mg Chlor

bzw. 0,585 mg NaCl entspricht. Man braucht also nur die verbrauchten Kubikzentimeter der Silberlösung mit diesen Zahlen zu multiplizieren, um die Anzahl Milligramm Cl bzw. NaCl in der angewandten Blutmenge zu erhalten. Wurde die Volhardsche Titrationsmethode angewandt, so ist die Menge verbrauchten Silbernitrats aus der zunächst zugegebenen Menge abzüglich der verbrauchten Kubikzentimeter Rhodanlösung zu berechnen.

Beispiel: Gewicht des abgewogenen Blutes 110 mg. Zur Titration verbraucht 1,15 ccm Silbernitratlösung. Gehalt der Lösung an Cl $1{,}15 \cdot 0{,}355 = 0{,}408$ mg, in 100 mg 0,371, in 100 g Blut 0,371 g Cl. Wird alles Chlor als NaCl berechnet, so ergibt sich der NaCl-Gehalt in der angewandten Blutmenge zu $0{,}585 \cdot 1{,}15 = 0{,}673$ mg, der NaCl-Gehalt in 100 mg Blut zu 0,612 mg, der NaCl-Gehalt in 100 g Blut also zu 0,612 g bzw. zu 0,612 %.

Bestimmung der Chloride.

Prinzip: Nach Zusatz von Salpetersäure und Silbernitratlösung wird das Blut mit Hilfe von Permanganat verascht und in der erhaltenen Asche das überschüssige Silber durch Rhodanammonlösung zurücktitriert.

Erforderliche Reagentien: 1. $^1/_{100}$ N-Silbernitratlösung; 2. $^1/_{100}$ N-Rhodanammonlösung; 3. verdünnte Salpetersäure frei von salpetriger Säure, Cl frei; 4. Kaliumpermanganatlösung, ungefähr normal; 5. Eisenoxydammoniakalaun, fein gepulvert; 6. reiner Traubenzucker, fein gepulvert (genau auf Cl-Freiheit zu prüfen).

Mit einer in Kubikmillimeter geteilten, 0,2 ccm fassenden Pipette nimmt man, wie S. 67 beschrieben, Blut aus der Fingerbeere bzw. Serum, wischt das außen anhaftende Blut ab und bläst den Inhalt in ein kleines, ca. 25 ccm fassendes Kölbchen aus Jenaer Glas hinein. Man wäscht die Pipette wiederholt in doppelt destilliertem Cl-freiem Wasser aus, welches man in Menge von ca. 2—3 ccm in einem Reagensglas bereit hat und gibt dieses Wasser ebenfalls in das Kölbchen hinein. Man gibt dazu 3—4 ccm verdünnte Salpetersäure, dann aus einer genauen Bürette 5 ccm Silbernitratlösung und 1—2 Tropfen Permanganatlösung. Mit kleiner Flamme wird zum Sieden erhitzt und 5 Minuten

bei gelindem Sieden erhalten. Sobald infolge des Verbrauchs des Permanganats zur Oxydation die rote Farbe der Lösung verschwunden ist, wird tropfenweise von neuem Permanganat zugegeben und dies so oft wiederholt, bis die rote bzw. rosa Farbe bestehen bleibt. Nach Ablauf von 5 Minuten wird die Flamme entfernt und der wenig abgekühlten Lösung zur Reduktion des überschüssigen Permanganats eine Messerspitze Traubenzucker zugefügt, wodurch die Lösung vollkommen entfärbt wird. Weiteres Kochen ist unbedingt zu vermeiden. Das ausgeschiedene Chlorsilber ist zu kleinen Komplexen zusammengeballt. Nach dem Erkalten wird eine Messerspitze Eisenalaun zugegeben und in üblicher Weise, bis zum Erscheinen einer rosa Färbung, mit Rhodanammon titriert.

Zur Berechnung wird die zum Zurücktitrieren verbrauchte Menge Rhodanammonlösung von der der zuerst zugefügten Silberlösung abgezogen und die Differenz mit 0,355 bzw. 0,585 multipliziert, je nachdem ob man die in der angewandten Menge vorhandenen Milligramm Cl oder NaCl erhalten will.

Beispiel: Angewandte Blutmenge 0,2 ccm, zugegeben Silbernitratlösung 5 ccm, zum Zurücktitrieren 2,6 ccm, verbrauchtes Silbernitrat also 2,4 ccm. Gehalt an Chlor $0{,}355 \cdot 2{,}4 = 0{,}852$ mg Cl in 0,2 ccm bzw. 0,426 g in 100 ccm Blut. Gehalt an NaCl (wobei alle Chloride als NaCl angenommen werden) 0,585 multipliziert mit $2{,}4 = 1{,}404$ mg in 0,2 ccm bzw. 0,702 g in 100 ccm oder 0,702 %.

Die Menge der Chloride im normalen Blut, als NaCl berechnet, beträgt ungefähr 650 mg %.

Bestimmung der Phosphate.

Eine Mikrobestimmung der verschiedenen Fraktionen des Phosphors im Blutserum, und zwar einerseits des im wesentlichen anorganischen Phosphors und andererseits des Lipoidphosphors, dem kleine Mengen Protein- bzw. Nuklein-Phosphor beigemengt sind, läßt sich nach dem Prinzip von Greenwald durch Fällung des Blutes mit einer essigsäurehaltigen Pikrinsäurelösung bewirken, in welcher der erstere Teil löslich ist, während der Lipoidphosphor in den Niederschlag geht. Die beiden Fraktionen

werden nach Trennung verascht und in den so erhaltenen klaren Lösungen mit Hilfe eines Molybdän-Strychnin-Reagens eine Trübung erzeugt, welche mit einer Trübung einer bekannten Menge Phosphor, nach dem gleichen Verfahren hergestellt, kolorimetrisch oder besser nephelometrisch verglichen wird.

Erforderliche Reagentien: 1. In einer Lösung von 1 Teil konzentrierter Essigsäure auf 99 Teile Wasser wird 1 Teil Pikrinsäure unter leichtem Erwärmen gelöst und die Lösung gut durchgemischt; 2. konzentrierte Schwefelsäure; 3. rauchende Salpetersäure; 4. verdünnte Salpetersäure (1 Teil konzentrierte Salpetersäure + 2 Teile Wasser); 5. Molybdänsäure-Strychnin-Reagens (Modifikation von Kleinmann): 30,4 g ammoniakfreie Molybdänsäure (MoO_3) und 9,6 g kristallwasserfreies Na_2CO_3 werden mit ungefähr 200 ccm Wasser so lange gekocht, bis sich die Molybdänsäure bis auf einige kleine Flocken (meistens Verunreinigungen) gelöst hat. Man filtriert, gibt der noch warmen Lösung 160 ccm konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,19) zu und läßt erkalten. Andererseits wird eine Lösung von 1,6 g reinem Strychninsulfat in ca. 100 ccm Wasser bei 90 Grad hergestellt und diese nach Erkalten zu der Molybdänsäurelösung gegeben. Man füllt die Mischung auf 1000 ccm auf und bewahrt in dunkler Flasche auf. 6. Phosphorsäure-Standardlösung: 302,9 mg $Na_2HPO_4 + 12\,H_2O$ werden in Wasser gelöst, die Lösung auf 1000 ccm aufgefüllt. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wird diese Stammlösung auf das 10fache verdünnt, es werden also 100 ccm auf 1000 ccm im Meßkolben verdünnt. Diese Lösung enthält in 5 ccm 0,03 mg P_2O_5.

In prinzipieller Anlehnung an das Greenwaldsche Verfahren wird 1 ccm Serum, das durchaus hämoglobinfrei sein muß, in einem Zentrifugenglas mit 8 ccm der Pikrinsäurelösung (1) versetzt und mit einem Glasstab gut durchgemischt. Man zentrifugiert in einer schnelllaufenden Zentrifuge scharf ab und gießt die überstehende Flüssigkeit, welche den anorganischen Phosphor enthält, in einen Mikrokjeldahlkolben vollständig ab. Man dampft bis zum Volumen von ungefähr 1 ccm ab, gibt nach Ab-

kühlen 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure hinzu und erhitzt weiter, bis alle Pikrinsäure entfernt ist. Zum Schlusse fügt man einige Tropfen konzentrierte Salpetersäure hinzu und erhitzt nochmals. Die Pikrinsäure muß vollständig entfernt sein, auch die vielleicht an den Wandungen haftende, was durch kurzes Erhitzen des Kolbenhalses leicht erreicht wird. Nach Abkühlen fügt man ca. 10 ccm Wasser hinzu. Ist die Flüssigkeit nicht völlig farblos, so kann die vorhandene gelbliche Färbung entweder durch Stickoxyd bedingt sein oder eine nicht völlige Veraschung anzeigen. Durch Erwärmen muß in ersterem Falle die Färbung verschwinden und man kann die Lösung weiter verarbeiten. Im anderen Falle muß eingedampft und die Veraschung durch Zusatz neuer Salpetersäure zu Ende geführt werden. Nach Beendigung der Veraschung und Abkühlung überträgt man den Inhalt des Kölbchens unter wiederholtem Nachspülen mit destilliertem Wasser in ein Meßkölbchen von 50 ccm, gibt als Indikator 2 Tropfen p-Nitrophenol (s. S. 162) zu, neutralisiert mit ungefähr 10%iger Natronlauge, bis eine schwache Gelbfärbung entstanden ist, und füllt auf 50 ccm auf. Von dieser Mischung bringt man — je nach dem erwarteten P-Gehalt — 15—25 ccm in ein Meßkölbchen von 50 ccm, gibt 5 ccm verdünnte Salpetersäure (4) hinzu und so viel Wasser, daß das Volumen 40—45 ccm beträgt und stellt zur Seite. Zum Rückstand im Zentrifugenglas, der den Lipoid-Phosphor enthält, werden 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure zugegeben; nach einigem Stehen entsteht eine gleichförmige Mischung. Man gibt diese in einen anderen Mikrokjeldahlkolben, spült mit möglichst wenig konzentrierter Salpetersäure nach und nimmt die Veraschung wie bei der anderen Probe vor. Diese erfolgt naturgemäß erheblich schwerer als die der Flüssigkeit. Man gibt in das Kölbchen von Zeit zu Zeit einige Tropfen konzentrierter Salpetersäure zu, gelegentlich auch einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, bis das Farbloswerden der Mischung die völlige Veraschung des zunächst schwarz werdenden Gemisches anzeigt. Hiernach

läßt man erkalten und überführt die Flüssigkeit unter Beachtung der oben angegebenen Maßregeln in ein 50 ccm Kölbchen, neutralisiert und verwendet 15—25 ccm der zur Marke aufgefüllten Lösung zur Analyse. Man gibt auch hier 5 ccm verdünnte Salpetersäure und Wasser bis zum Volumen von ungefähr 45 ccm hinzu und stellt ebenfalls beiseite. Andererseits bereitet man in einem 50 ccm Kölbchen eine Mischung aus 5 ccm der verdünnten P_2O_5-Lösung mit einem Gehalt an 0,03 mg P_2O_5 in dieser Menge, fügt ebenfalls 5 ccm verdünnte Salpetersäure zu und verdünnt gleichfalls bis zu ungefähr 45 ccm. Man setzt nun zu den 3 Meßkolben, deren Inhalt vorher gut durchzumischen ist, je 2 ccm des Molybdän-Strychnin-Reagens, das, wenn nicht ganz klar, vorher filtriert werden muß, füllt bis zur Marke auf und läßt 20 Minuten stehen. Der Vergleich erfolgt am besten im Nephelometer, bei dessen Benutzung auch ziemlich weit auseinanderliegende Differenzen richtig angegeben werden. Man kann die Ablesung aber auch im Kolorimeter vornehmen; die Werte werden aber hier nur dann Anspruch auf Genauigkeit machen können, wenn sie nicht zu weit von denen der Testlösung differieren. In diesem Falle wäre es also zweckmäßig, sich zu gleicher Zeit mehrere Testlösungen auf die gleiche Art, nur mit wechselnden Mengen der Phosphorsäurelösung, herzustellen und die passendste zum Vergleiche zu wählen.

Beispiel: Es seien 1 ccm Serum in Arbeit genommen. Sowohl die säurelösliche Fraktion (also in der Hauptsache der anorganische Phosphor) wie die Fällung (Lipoidphosphor) seien nach Veraschung auf 50 ccm aufgefüllt und von diesen je 25 ccm zur nephelometrischen Bestimmung benutzt. Die Testlösung enthält in 50 ccm 0,03 mg. Würde im Nephelometer bei gleicher Schichtdicke der Testlösung und der Versuchslösung gleiche Helligkeit bestehen, so würden 25 ccm der Versuchslösung, die ja auf 50 ccm aufgefüllt waren, ebenfalls 0,03 mg P_2O_5 enthalten, 50 ccm dieser Lösung bzw. 1 ccm Serum, aus dem sie gewonnen ist, also 0,06 mg P_2O_5, d. h. 100 ccm Serum würden 6 mg P_2O_5 enthalten. Ist die Schichtdicke bei Gleichheit der Felder ungleich, so

hat auch für die nephelometrische Ablesung das für die Kolorimetrie entwickelte Gesetz Geltung. Die Konzentration der Versuchslösung ist gleich der Konzentration der Vergleichslösung multipliziert mit dem Quotienten der Schichtdicke der Vergleichslösung durch die Schichtdicke der Versuchslösung oder $\frac{s_1}{s}$. Es sei für die säurelösliche Fraktion s_1 20 mm, s 30 mm; dann ergibt sich die Konzentration des säurelöslichen P_2O_5 in 100 ccm Serum zu $\frac{20}{30} \cdot 6 \text{ mg } P_2O_5 = 4 \text{ mg } P_2O_5$.

Sei andererseits für die Lipoidfraktion $s_1 = 40$, $s = 30$, so ergibt sich die Menge des Lipoid-P_2O_5 in 100 ccm Serum zu $\frac{40}{30} \cdot 6 \text{ mg } P_2O_5 = 8 \text{ mg } P_2O_5$.

Die Menge des P ergibt sich aus den erhaltenen Werten durch Multiplikation mit 0,437.

Normales Blut enthält ungefähr 4 mg % anorganischen, 5 mg % organischen P.

Bestimmung des Natriums[1].

Prinzip: Das Natrium wird mit Pyroantimoniat in Natriumpyroantimoniat übergeführt und das Antimon jodometrisch bestimmt.

Gebrauchte Reagentien: 1. Kaliumpyroantimoniatlösung: 2 g Pyroantimoniat ($K_2H_2Sb_2O_7 + 6H_2O$) werden in 1 l Wasser gelöst. 2. Alkohol 95%ig. 3. Kaliumjodidlösung 2%ig. 4. Salzsäure, konzentriert 1,19. 5. Stärkelösung 1%ig. 6. Natriumthiosulfatlösung n/100.

In ein kleines Zentrifugierglas aus Jenaer Glas wird 1 ccm Wasser eingebracht, sodann mit einer Pipette 0,1 ccm Serum oder Plasma abgemessen und in das Reagensglas hereingeblasen. Die Pipette wird durch Auswaschen mit der im Zentrifugenglas befindlichen Lösung und nachheriges Ausblasen gereinigt. Man gibt nun 1 ccm Reagens (1) und 10 Tropfen (0,4 ccm) 95%igen Alkohol zu. Man mischt durch leichtes Umschwenken

[1]) H. Müller (Physiol. chem. Anstalt Basel). Helv. chim. act. VI.

und läßt 2 Stunden stehen. Darauf wird zentrifugiert und danach die überstehende Lösung mit dem kleinen bei der Kaliumbestimmung beschriebenen Apparat abgeblasen. Man gibt 2 ccm 30%igen Alkohol zu, wirbelt dabei etwas auf, zentrifugiert wieder, bläst die klare Flüssigkeit ab und wiederholt diese Manipulation noch zweimal. Nach Entfernung der letzten Flüssigkeit wird das Gläschen in ein Wasserbad von 80—100 Grad eingestellt, bis die letzten Spuren von Alkohol verschwunden sind. Durch Absaugen kann man dies noch beschleunigen. Nach dem Abkühlen wird zum Rückstand 1 ccm KJ-Lösung (3) und 1 ccm konzentrierte Salzsäure, ferner 2 ccm Wasser zugefügt, leicht gemischt und 10 Minuten stehengelassen. Danach werden 2 Tropfen Stärkelösung zugegeben und mit n/100 Thiosulfatlösung bis zum Verschwinden der Blaufärbung in üblicher Weise titriert.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß die zur Titration gebrauchten Kubikzentimeter Thiosulfatlösung mit 0,115 multipliziert die mg Natrium ergeben.

Beispiel: Es seien zur Titration gebraucht 2,32 ccm Thiosulfat, die Menge des Natriums ergibt sich demnach zu 0,267 mg in 0,1 ccm, zu 0,267 g in 100 ccm Serum.

Die Menge des Na im normalen Blut beträgt ungefähr 0,33 g %.

Bestimmung des Kaliums (nach Kramer).

Prinzip: Das Kalium wird direkt im Serum als Kobaltnitrit-Doppelverbindung gefällt und diese durch oxydimetrische Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1. Natrium-Kobaltnitritreagens. Es wird hergestellt Lösung A: 5 g Kobaltnitrat werden in 100 ccm Wasser gelöst und der Lösung 2,5 ccm Eisessig zugegeben. Lösung B: 24 g kaliumfreies Natriumnitrit werden in 36 ccm Wasser gelöst, was ungefähr 44 ccm Lösung ergibt. Zur Herstellung des fertigen Reagens werden zu der gesamten Lösung A 42 ccm der Lösung B zugefügt, wobei sich Stickoxyde entwickeln. Durch die Lösung wird so lange Luft durchgeblasen, bis keine Gase mehr entweichen. Das Reagens ist dann

fertig und hält sich im Eisschrank mindestens einen Monat lang unverändert. Vor dem Gebrauch stets filtrieren. 2. 20volumenprozentige Schwefelsäure (20 ccm konzentrierte Schwefelsäure + 80 ccm destilliertes Wasser). 3. $^1/_{100}$ N-Oxalsäurelösung hergestellt aus 10 ccm n/10 Oxalsäurelösung + 2 ccm n/10 H_2SO_4, mit Wasser auf 100 ccm zu verdünnen. 4. $^1/_{100}$ N-Kaliumpermanganatlösung.

In ein Zentrifugenglas wird 1 ccm Serum einpipettiert und 2 ccm Kobaltreagens tropfenweise zugegeben. Nach $^3/_4$ Stunden werden ungefähr 2 ccm Wasser zugefügt und scharf abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt, indem der kleine Apparat (Abb. 12) fest auf das Zentrifugenglas aufgesetzt wird und durch das Mundstück kräftig, aber vorsichtig Luft eingeblasen wird. Zum Rückstand werden ca. 6 ccm Wasser zugegeben, leicht gemischt wieder zentrifugiert, das Wasser wieder abgeblasen und dieses Verfahren so oft (2—3 mal) wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit ganz farblos ist. Nachdem nunmehr das Wasser in gleicher Weise entfernt worden ist, wird zum Rückstand ein Überschuß der Kaliumpermanganatlösung (ca. 5 ccm aus einer Bürette genau gemessen) und 1 ccm Schwefelsäure zugefügt, mit einem dünnen Glasstäbchen aufgerührt und $1^1/_2$ Minuten in ein siedendes Wasserbad (kleines Becherglas) gestellt, wobei die rote Farbe nicht völlig verschwinden darf. Ist dies dennoch der Fall, so muß etwas Permanganat nachgegeben und noch $^1/_2$ Minute erhitzt werden. Man nimmt aus dem Wasserbad heraus, gibt unter leichtem Umrühren 2—3 ccm Oxalsäurelösung dazu, so daß die Flüssigkeit farblos wird. Aus der anderen Bürette gibt man dann so lange Permanganatlösung hinzu, bis gerade eine rötliche Färbung auftritt, die 1 Minute lang bestehen bleibt.

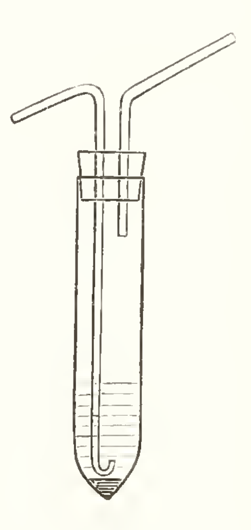


Abb. 12.

Berechnung: 1 ccm $^1/_{100}$ N-Kaliumpermanganat oxydiert so viel Kalium-Kobaltnitrit, wie 0,071 mg Kalium

entspricht. Durch Multiplikation der verbrauchten Kubikzentimeter Permanganat abzüglich der zugegebenen Oxalsäuremenge mit 7,1 erhält man die Milligramm Kalium in 100 ccm Serum.

Beispiel: Angewandt 1 ccm Serum, zugegeben 4 ccm $^1/_{100}$ N-Permanganatlösung, nach dem Kochen zur Entfärbung 2 ccm Oxalsäurelösung, 1,2 ccm Permanganat bis zur rosa Färbung. Zur Oxydation demnach erforderlich 4 ccm + 1,2 ccm — 2 ccm = 3,2 ccm. Durch Multiplikation mit 7,1 erhält man den Wert 22,72 mg K in 100 ccm Serum.

Der K-Gehalt des normalen Blutes beträgt ungefähr 20 mg %.

Bestimmung des Kalziums.

Prinzip: Mit Zitrat ungerinnbar gemachtes Blut wird hämolysiert, die klare Blutlösung mit Oxalat gefällt und die aus dem Niederschlag freigemachte Oxalsäure mit Permanganat bestimmt.

Notwendige Reagentien: 1. 5%ige Ammoniumchloridlösung, 2. 3%ige Ammoniumoxalatlösung, 3. 5%ige Natriumzitratlösung, 4. $^1/_{100}$ Normal-Kaliumpermanganatlösung, 5. n-Schwefelsäure.

Ein Meßkölbchen von 10 ccm wird mit genau 1 ccm Zitratlösung beschickt und das Kölbchen mit Blut aus der Spritze direkt bis zur Marke aufgefüllt. Man überspült nach Mischen den Inhalt unter wiederholtem Nachspülen in ein Meßkölbchen von 50 ccm, gibt warmes destilliertes Wasser bis zur fast völligen Füllung zu, mischt gut durch und läßt zur vollständigen Hämolyse ungefähr $^1/_2$ Stunde lang stehen. Man füllt zur Marke auf, mischt wieder durch, bringt den Inhalt in ein oder zwei Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert nun scharf, so daß das Stroma sich vollständig am Boden absetzt und die Lösung ganz durchsichtig erscheint. Von dieser überstehenden Lösung wird, um Doppelanalysen zu haben, je ein aliquoter Teil (z. B. 15 ccm), der sehr vorsichtig zu entnehmen ist, damit keine Stromateilchen mitgenommen werden, in ein anderes Zentrifugenglas überführt, 1 ccm der Ammoniumchlorid-

lösung (1) zugegeben, gut gemischt und dann sehr langsam unter dauerndem Mischen mit einem dünnen Glasstab 3 ccm der Oxalatlösung zugefügt. Man läßt nun mindestens 16 Stunden stehen, damit das Calcium vollständig ausgefällt wird. Hiernach zentrifugiert man scharf, gießt darauf die überstehende Lösung ab, gibt unter leichtem Aufrühren des Niederschlages nochmals ungefähr 25 ccm kaltes destilliertes Wasser in das Röhrchen, zentrifugiert nochmals und wiederholt diese Prozedur, wenn der Niederschlag noch nicht rein weiß und die überstehende Flüssigkeit noch gefärbt sein sollte. Darauf gibt man nach Abgießen des letzten Waschwassers zum Niederschlag 5 ccm n-Schwefelsäure (5), erwärmt das Röhrchen im Wasserbad auf 75—80 Grad und titriert bei dieser Temperatur unter dauerndem Rühren gegen einen weißen Untergrund mit n/100 Kaliumpermanganatlösung aus einer Mikrobürette, bis eine rosa Färbung die Beendigung der Reaktion anzeigt. Die beiden Analysen müssen auf 2 Teilstriche = $^2/_{100}$ ccm miteinander übereinstimmen.

Das Verfahren ist das gleiche für Plasma. Das Blut wird mit Zitrat-Zusatz entnommen, zunächst die Blutkörperchen abzentrifugiert und das so erhaltene Plasma zur Analyse verwendet. Man nimmt 5 ccm Plasma in Arbeit, setzt die gleiche Menge Ammoniumchloridlösung wie für Blut und nach Mischen langsam 10 ccm einer 3 $^0/_0$igen Ammonoxalatlösung zu. Im übrigen verfährt man wie beim Vollblut. Auch Serum wird in derselben Weise verarbeitet.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß durch 1 ccm $^1/_{100}$ n-Permanganatlösung 1 ccm $^1/_{100}$ Normal-Oxalsäurelösung, entsprechend 0,6305 mg Oxalsäure $(COOH)_2 + 2H_2O$, oxydiert wird. Diese Menge entspricht andererseits 0,64 mg Kalziumoxalat oder 0,2 mg Kalzium. Es seien 9 ccm Vollblut in Arbeit genommen, auf 50 ccm aufgefüllt und 15 ccm davon weiter verarbeitet worden. Zur Titration der aus dem Kalziumoxalat freigesetzten Oxalsäure seien im Mittel 1,6 ccm Permanganat verbraucht worden, dann wäre der Kalkgehalt der Probe $1{,}6 \cdot 0{,}2 = 0{,}32$ mg. Da nicht die ganze Blutmenge, sondern nur 15 ccm des auf

50 ccm verdünnten Blutquantums zur weiteren Verarbeitung genommen worden waren, so muß diese Zahl, um den Kalkgehalt in 9 ccm Blut zu erhalten, noch mit $\frac{50}{15}$ multipliziert werden; wir bekommen also in 9 ccm einen Kalkgehalt von $0{,}32 \cdot \frac{50}{15} = 1{,}067$ mg, also in 100 ccm Blut einen Kalkgehalt von 11,9 mg.

Der Ca-Gehalt des normalen Blutes beträgt ungefähr 10 mg %.

Bestimmung des Magnesiums[1]).

Prinzip: Im vom Kalk befreiten Serum oder Plasma wird mit phosphorsaurem Ammoniak phosphorsaure Ammoniak-Magnesia ausgefällt: Die Phosphorsäure der Verbindung wird kolorimetrisch bestimmt und daraus das Magnesium berechnet.

Gebrauchte Reagentien: 1. Molybdänsäurelösung (50 g Ammonmolybdat werden mit n-Schwefelsäure auf 1000 ccm gelöst). 2. Hydrochinonlösung: 20 g Hydrochinon werden auf 1000 ccm Wasser gelöst und 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt. 3. Karbonatsulfitlösung: 1000 ccm 20%ige Natriumkarbonatlösung werden mit 250 ccm 15%iger Natriumsulfitlösung (Na_2SO_3) gemischt. 4. Standardlösung: 4,387 g reines saures Kaliumphosphat (KH_2PO_4 zu Enzymstudien nach Sörensen) wird auf 1 l gelöst. Die Lösung wird zum Gebrauch auf das 20fache verdünnt; sie enthält dann in 2 ccm 0,1 mg P. 5. Ammoniumoxalatlösung 3%ig. 6. Ammoniumphosphatlösung 2%ig. 7. Ammoniak 20%ig. 8. Ammoniaklösung 2%ig (10 ccm 20%iger Lösung mit Wasser ad 100). 9. n-Schwefelsäure.

2 ccm Serum oder Plasma werden in einem Zentrifugenglas zur Entfernung des Kalziums mit 3 ccm Wasser und 1 ccm Ammoniumoxalatlösung (5) versetzt und mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde stehengelassen. Nach dieser Zeit wird zentrifugiert und von der klaren überstehenden Lösung 5 ccm in ein anderes Zentrifugenglas überführt.

[1]) Gadient (Physiol. chem. Institut Basel). Helv. chim. act. IV.

In dieses werden ferner 1 ccm Ammoniumphosphatlösung (6) und 2 ccm 20%iges Ammoniak (7) zugefügt, mit einem feinen Glasstab gemischt und das Zentrifugenglas mit Inhalt auf 5 Minuten in ein Wasserbad von 80 Grad eingestellt. Man nimmt heraus und läßt bis zum nächsten Tag leicht verschlossen stehen. Sodann wird scharf zentrifugiert, wobei sich der Niederschlag von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia am Boden des Zentrifugenglases absetzt. Es wird nunmehr die klare überstehende Flüssigkeit möglichst vollständig abgegossen, ungefähr die gleiche Menge 2%iger Ammoniaklösung (8) zugefügt und wieder zentrifugiert. Diese Behandlung wird noch zweimal wiederholt; nachdem die letzte Flüssigkeit abgegossen ist, wird ungefähr 0,5 ccm n-Schwefelsäure (9) zugegeben und auf diese Weise der Niederschlag gelöst. Durch leichtes Erwärmen wird dieser Prozeß, wenn er nicht ohne dies glatt vor sich gehen sollte, beschleunigt. Man spült nun mit 10 ccm destilliertem Wasser den Inhalt des Zentrifugenröhrchens quantitativ in ein Meßkölbchen von 25 ccm über. In ein zweites Meßkölbchen der gleichen Größe bringt man 2 ccm der auf das 20fache verdünnten Standardlösung (5) und gibt 8 ccm destilliertes Wasser dazu. Nach leichtem Mischen gibt man in jedes Kölbchen 1 ccm Molybdänsäurelösung (1), mischt leicht, fügt sodann je 2 ccm Hydrochinonlösung zu, mischt wieder und läßt 5 Minuten stehen. Danach werden in jedes Kölbchen 5 ccm der Karbonat-Sulfitlösung zugegeben und nach leichtem Umschwenken bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die erhaltenen durchmischten Lösungen werden im Kolorimeter sofort verglichen.

Die Berechnung erfolgt auf Grund der Tatsache, daß in der Verbindung $MgNH_4PO_4$ mit dem Molekulargewicht 137,3 (phosphorsaure Ammoniakmagnesia, als welche das Magnesium ausgefällt worden ist) 31 Teile Phosphor 24,3 Teilen Magnesium entsprechen. Da kolorimetrisch der Wert des Phosphors ermittelt wird, muß demnach zur Berechnung des Magnesiums mit $\frac{24 \cdot 3}{31} = 0,784$ multipliziert werden.

Beispiel: Der kolorimetrische Vergleich der aus dem Blut gewonnenen Lösung mit der Testlösung habe ergeben, daß Farbengleichheit bei einem Stand der Versuchslösung von 46 und der Testlösung von 30 war. Da die Vergleichslösung 0,1 mg P enthielt, so ergibt sich nach der kolorimetrischen Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$ die Menge des in der Blutprobe enthaltenen P zu $0{,}1 \cdot \frac{30}{46} = 0{,}0652$ mg. Da 2 ccm Serum zunächst auf 6 ccm verdünnt, nach der Fällung des Kalziums davon 5 ccm benutzt worden waren, ist der berechnete P-Gehalt in

$$2 \cdot \frac{5}{6} \text{ ccm Serum} = 1{,}67 \text{ ccm}$$

enthalten. 100 ccm Serum enthalten also $0{,}0652 \cdot 100 : 1{,}67 = 3{,}904$ mg P. Zur Ermittlung des Mg-Gehaltes, wird, wie oben angegeben, mit 0,784 multipliziert: es ergibt sich 3,06 mg Mg in 100 ccm Serum.

Die Menge des Magnesiums in normalem Blut beträgt ungefähr 2 mg %.

Bestimmung von Kalium, Natrium und Kalzium (nach Kramer und Tisdall).

Prinzip: Nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure wird in verschiedenen Teilen des Filtrates Kalium, Natrium und Kalzium bestimmt: das erste als Kobaltnitritverbindung, das zweite als Pyroantimoniat und das letzte als Oxalat.

Notwendige Reagentien: 1. Trichloressigsäure, 12%ige Lösung; 2. Oktylalkohol; 3. Natriumreagens: Kaliumpyroantimoniatlösung: zu 500 ccm kochendem destilliertem Wasser in einem Jenaer Kolben werden 10 g Kaliumpyroantimoniat zugefügt und 3—5 Minuten weitergekocht. Darauf wird schnell unter fließendem Wasser abgekühlt und 15 ccm einer 10%igen Kalilauge (aus mit Alkohol gereinigtem KOH) zugegeben. Nach 24 Stunden wird durch ein aschefreies Filter in eine innen mit Paraffin ausgeschwenkte Flasche hineinfiltriert. Haltbarkeit ungefähr ein Monat; 4. 95%iger Alkohol; 5. 30%iger Alkohol; 6. Kaliumreagens: Kobaltnitritlösung (bei Kaliumbestimmung be-

schrieben); 7. $^{1}/_{100}$ N-Kaliumpermanganatlösung; 8. $^{1}/_{100}$ N-Oxalsäure; 9. 20volumenprozentige Schwefelsäure; 10. Kalziumreagens: gesättigte Ammoniumoxalatlösung; 11. gesättigte Lösung von Natriumazetat, filtriert.

Ein Meßkölbchen von 50 ccm wird mit 25 ccm destilliertem Wasser beschickt und gewogen. Man entnimmt aus der Vene mit einer Spritze 7—8 ccm Blut, gibt dies unmittelbar langsam unter ständigem Bewegen des Kölbchens in dieses herein und wägt wieder, wodurch die Menge des angewandten Blutes bestimmt wird. Man kann auch, wenn man die Resultate auf Blutvolumina beziehen will — was praktisch keinen großen Unterschied macht — eine gemessene Menge Blut in das in gleicher Weise mit Wasser beschickte Kölbchen hereingeben. Nach Zugabe von 1—2 Tropfen Oktylalkohol werden langsam unter leichtem Umschütteln 12—13 ccm Trichloressigsäure zugefügt. Nach zehnminutenlangem Stehen wird zur Marke aufgefüllt, gemischt, der Inhalt in ein oder mehrere Zentrifugengläser eingebracht und scharf zentrifugiert. Einen gemessenen Teil der klaren Lösung dampft man in einer Glas- oder Porzellanschale auf dem Wasserbad zur Trockne ab, löst den Rückstand durch Zugabe von $^{1}/_{10}$ N-Salzsäure, überführt die Lösung in ein Meßkölbchen von 10 ccm und füllt zur Marke auf. Von dieser Lösung, die etwas opaleszent ist, werden 4 ccm zur Natriumbestimmung, 0,5 ccm zur Kaliumbestimmung und 4 ccm zur Kalziumbestimmung verwendet.

Bestimmung des Natriums: 4 ccm der Lösung werden im Platintiegel auf ca. 2 ccm eingedampft, darauf unter Zugabe eines Tropfens Phenolsulfophthalein mit 10%iger Kalilauge alkalisiert (10—12 Tropfen). Man gibt dazu 10 ccm des Pyroantimoniatreagens und 3 ccm 95%igen Alkohol tropfenweise unter Umrühren. Nach 30 Minuten wird der Niederschlag durch einen nach Trocknen zur Gewichtskonstanz gewogenen Goochtiegel unter mäßigem Saugen filtriert. Statt der früher mit Asbest selbst hergestellten Goochtiegel verwendet man zweckmäßig die gebrauchsfertigen Goochtiegel aus Porzellan der Staatlichen Porzellanmanufaktur Berlin oder die aus Glas nach besonderem Verfahren erzeugten Filtriertiegel von

Schott & Gen., Jena. Trocknung erfolgt durch einstündiges Erwärmen auf 110° und nachheriges Abkühlen im Exsikkator. Die durchlaufende Flüssigkeit muß natürlich klar sein, sonst ist der Goochtiegel unbrauchbar. Nachdem der Niederschlag abgesaugt ist, wird mit 5—10 ccm 30%igem Alkohol nachgewaschen und der Tiegel nun wiederum bei 110° getrocknet, in den Exsikkator überführt und dann gewogen.

Berechnung: Das Gewicht des Pyroantimoniatniederschlages in Milligramm, dividiert durch 11,08, ergibt die Menge Natrium in der für die Natriumbestimmung angewandten Blutmenge.

Bestimmung des Kaliums: 0,5 ccm der Lösung werden in einem Zentrifugenrohr mit 0,5 ccm Wasser verdünnt und 0,5 ccm einer Natriumnitritlösung (15 g K-freies Natriumnitrit in 30 ccm Wasser) zugefügt. Mit einem feinen Glasstab mischen und 5 Minuten stehenlassen. Dann 4 ccm Wasser zugeben, wieder mischen und 2 ccm Kobaltnitritreagens tropfenweise zufügen. Mischen und ½ Stunde stehenlassen. Darauf wird scharf zentrifugiert und in gleicher Weise verfahren, wie bei der Kaliumbestimmung angegeben. Das gleiche gilt für Titration und Berechnung.

Kalziumbestimmung: 4 ccm Lösung werden in ein mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat gereinigtes Zentrifugenglas gegeben, dazu 1 ccm Ammoniumoxalatlösung und 2 ccm Natriumazetatlösung gemischt. Man läßt 1 Stunde stehen, füllt mit Wasser auf ungefähr 8 ccm auf, mischt wieder und zentrifugiert scharf ab. Mit der kleinen, früher (S. 77) beschriebenen Vorrichtung entfernt man die Hauptmenge der überstehenden Lösung, verteilt den Rückstand durch leichtes Bewegen in dem Rest der Flüssigkeit und gibt dann 2%ige Ammoniaklösung (2 ccm konzentriertes Ammoniak, mit Wasser auf 100 ccm verdünnt) bis zu 4 ccm zu, wobei man aufpaßt, daß an den Wänden kein Oxalat hängen bleibt. Man zentrifugiert, entfernt die überstehende Flüssigkeit, gibt nochmals Ammoniak dazu, zentrifugiert wieder, entfernt wieder das Wasser, mischt darauf durch leichtes Neigen den Niederschlag mit dem Flüssigkeitsrest und fügt nun 2 ccm einer ungefähr Normalschwefelsäure dazu. Man

erwärmt das Zentrifugenröhrchen in einem kochenden Wasserbad (Becherglas) während 3 Minuten und titriert noch heiß mit $^1/_{100}$ N-Permanganatlösung, bis eine rosa Färbung 1 Minute lang bestehen bleibt.

Berechnung: Diese ist die gleiche wie bei der Kalziumbestimmung nach Clark angegeben: 1 ccm $^1/_{100}$ Permanganatlösung entspricht 0,2 mg Kalzium in der für die Analyse verwandten Blutmenge.

Berechnung der Gesamtanalyse: Beispiel: Angewandt waren 8 ccm Blut, die auf 50 ccm nach der Enteiweißung aufgefüllt waren. Beim Zentrifugieren wurden 35 ccm Flüssigkeit gewonnen, die nach Eindampfen auf 10 ccm aufgefüllt wurden. Diese entsprechen also

$$\frac{8 \cdot 35}{50} = 5{,}6 \text{ ccm Blut,}$$

jeder Kubikzentimeter also 0,56 ccm Blut.

Für die Natriumbestimmung waren angewandt 4 ccm der Lösung = 2,24 ccm Blut. Das Gewicht des Pyroantimoniatniederschlages war 56 mg, demnach waren 56 dividiert durch 11,08 = 5,05 mg Natrium in der angewandten Blutmenge von 2,24. Demnach enthalten 100 ccm Blut 225 mg Na oder 0,225 %.

Für die Kaliumbestimmung wurden angewandt 0,5 ccm Lösung = 0,28 ccm Blut. Gebraucht zur Titration nach Abzug der zugesetzten Oxalsäure 1,1 ccm Permanganatlösung. Kaliumgehalt also 1,1 · 0,071 = 0,0781 mg in 0,28 ccm, in 100 ccm also 27,9 mg oder 0,0279 %.

Zur Kalziumbestimmung waren angewandt 4 ccm Lösung = 2,24 ccm Blut. Zur Titration verbraucht 1,22 ccm Permanganatlösung, Kalziumgehalt demnach 1,22 · 0,2 mg = 0,244 mg Ca in 2,24 ccm Blut, in 100 ccm also 10,9 mg Ca bzw. 0,0109 %.

Bestimmung des Eisens.

Prinzip: Blut wird mit konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffsuperoxyd verascht, durch Zusatz von Rhodankali rotes Rhodaneisen gebildet, das kolorimetrisch mit einer Rhodaneisenlösung aus einer bekannten Menge Eisenchlorid verglichen wird.

Gebrauchte Reagentien: (Sämtliche Fe frei!) 1. Schwefelsäure konzentriert. 2. Wasserstoffsuperoxyd, 30%ige Lösung (Perhydrol). 3. Rhodankaliumlösung: 15 g Rhodankalium werden in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. 4. Eisenchlorid-Standardlösung, enthaltend 0,01 g Eisen im Kubikzentimeter (wird zweckmäßig fertig bezogen, kann auch durch Lösung von 2,9095 g trocknem Eisenchlorid auf 100 ccm Wasser hergestellt werden. Die selbst hergestellte Lösung muß analytisch kontrolliert sein!).

Mit einer genauen Pipette von 0,1 ccm werden 0,1 ccm Blut entweder direkt aus der Fingerbeere oder von durch Hirudin oder durch 0,2% trocknes Kaliumoxalat ungerinnbar gemachtem Blute entnommen. Die Pipette wird außen gut abgewischt, der Inhalt in einen Mikrokjeldahlkolben hereingeblasen. In einem Reagensglas, welches ungefähr 2 ccm destilliertes Wasser enthält, wird die Pipette wiederholt gut ausgespült und auch das Spülwasser in das Kölbchen gegeben. Es werden 25 Tropfen konzentrierte H_2SO_4 (ca. 0,8 ccm) zugefügt und das Kölbchen erst langsam, dann intensiver erhitzt, bis weiße Schwefelsäuredämpfe aufsteigen und das Erhitzen dann noch 2 Minuten lang fortgeführt. Man läßt abkühlen, fügt ungefähr 0,5 ccm Wasserstoffsuperoxyd (2) dazu und erhitzt nochmals bis zur Bildung weißer Dämpfe und 2 Minuten länger. Ist die Lösung jetzt völlig farblos, so ist die Veraschung vollendet, sonst muß nochmals Perhydrol zugefügt und auf gleiche Weise die Veraschung fortgesetzt werden. Nachdem die Flüssigkeit ganz farblos geworden ist, läßt man abkühlen und überführt nach Verdünnen mit etwas Wasser die Lösung in ein Röhrchen mit Glasstopfen, welches je eine Marke bei 15 und 25 hat. Man spült mit Wasser aus dem Kjeldahlkolben nach, bis die Lösung bis zur Marke 15 geht, setzt den Glasstopfen auf und schüttelt um. Andererseits wird die Vergleichslösung aus der Standardlösung folgendermaßen (frisch!) hergestellt.

Zunächst werden 10 ccm der Lösung (4) auf das 50fache verdünnt, indem in einem Meßkolben von 500 ccm 10 ccm eingebracht und bis zur Marke aufgefüllt wird. Von

dieser Lösung wird nochmals eine 10fache Verdünnung hergestellt, indem 10 ccm auf 100 ccm aufgefüllt werden. Von dieser Verdünnung, welche im Kubikzentimeter 0,02 mg Eisen enthält, werden 5 ccm enthaltend 0,10 mg Eisen in ein anderes gleiches Röhrchen eingefüllt, 20 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugefügt, ebenfalls mit Wasser bis zu 15 ccm aufgefüllt und nach Aufsetzen des Glasstopfens gemischt. In beide Röhrchen kommen nun je 10 ccm Rhodankalilösung (3) (bis zur Marke 25): nach Aufsetzen des Stopfens wird gemischt und im Kolorimeter (Blauscheibe zweckmäßig!) verglichen.

Beispiel: Es sei Farbengleichheit erzielt, wenn die aus der Standardlösung hergestellte Mischung die Schichtdicke 30, die aus dem Blut gewonnene Lösung die Schichtdicke 32 hat. Da die Testlösung 0,1 mg Fe enthält, so ergibt sich nach der wiederholt angegebenen Formel: $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$ die Konzentration des Eisens im Blut zu $0,1 \cdot \frac{30}{32}$ mg oder 0,0938 mg in 0,1 ccm. Dementsprechend enthalten 100 ccm Blut 0,0938 g oder 93,8 mg Fe.

Bestimmung des Reststickstoffes im Blut.

A. Halbmikrobestimmung im Serum.

Zur Enteiweißung erforderliche Reagentien: 1. kolloidales Eisenhydroxyd (möglichst chlorarm), 2. gesättigte $MgSO_4$-Lösung[1]). 2 ccm Serum werden mit einer Vollpipette in einen Meßkolben von 100 ccm überführt, ungefähr 50 ccm destilliertes Wasser langsam, um Schaumbildung zu vermeiden, zugefügt und 5 ccm kolloidales Eisenhydroxyd (Ferrum oxydatum dialysatum) zugegeben. Nach guter Mischung gibt man 2 ccm einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat zu, wodurch das gesamte Eiweiß mit dem absorbierenden Eisenkolloid ausgefällt wird. Man verdünnt durch Auffüllen mit destilliertem Wasser bis

[1]) $MgSO_4$ enthält häufig NH_3. Stets vor Gebrauch prüfen und reinste Präparate („mit Garantieschein") verwenden!

zur Marke, mischt wiederum durch und läßt ungefähr $^1/_4$ Stunde stehen, bis sich der Niederschlag etwas gesetzt hat. Darauf filtriert man durch einen trockenen Trichter mit Hilfe eines trocknen Filters in ein trocknes Gefäß und nimmt von dem Filtrat 50 ccm, entsprechend also 1 ccm des angewandten Serums, zur Bestimmung. War weniger Serum verfügbar, so kann man diese Manipulation mit den halben Mengen vornehmen; in diesem Falle nimmt man aber eine größere Menge des Filtrates, 35 oder 40 ccm, die man leicht erhalten kann, zur Analyse. In einer kleinen Probe des Filtrates prüft man auf die Abwesenheit von Eiweiß, am besten durch Ansäuerung mit konzentrierter Essigsäure und Zugabe eines Tropfens Ferrozyankaliumlösung, 10 $^0/_0$ig; bei Gegenwart von Eiweiß sofort auftretende Trübung. Mit Hilfe einer Pipette mißt man die zur Analyse verwandten 50 ccm in einen Mikrokjeldahlkolben, gibt 1 ccm bzw. 30 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure und 4 Tropfen 10 $^0/_0$ige Kupfersulfatlösung dazu, dampft, nachdem man zum Vermeiden des Stoßens einige Glasperlen zugefügt hat, über kleiner Flamme das Wasser weg und verbrennt weiter, bis die zuerst schwarz, dann gelb gefärbte Lösung grünlich geworden ist. Man verfährt im übrigen genau wie bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffs im Harn (s. S. 44); auf die Prüfung der Reagentien wird besonders aufmerksam gemacht. Auch die Destillation erfolgt in der dort angegebenen Weise.

Berechnung: Wurden n/50 Normallösungen angewandt, so ergibt die Differenz zwischen vorgelegter Säure und verbrauchter Natronlauge, multipliziert mit 0,28, die Anzahl Milligramm Reststickstoff in 1 ccm Blut.

Beispiel: 5 ccm n/50 H_2SO_4 vorgelegt, zum Zurücktitrieren (Indikator Methylrot) verbraucht 3,2 ccm n/50 NaOH. Differenz $1{,}8 \cdot 0{,}28 = 0{,}504$ mg Rest-N in 1 ccm, 50,4 mg in 100 ccm Serum.

Eine andere Methode zur Bestimmung des Reststickstoffes im Serum, die besonders gute Ergebnisse bei verhältnismäßig leichter und schneller Arbeitsweise gibt, besteht in folgendem: zu 2 ccm Serum werden 16,4 ccm Wasser zugegeben, gemischt und 0,8 ccm 20 $^0/_0$ige Tri-

chloressigsäure zugefügt. Man mischt wieder und gibt nun 0,8 ccm 10% Wolframatlösung (wie unten bei Halbmikrobestimmung im Vollblut (1) angegeben) dazu. Es wird gut gemischt, abfiltriert und 10 ccm des eiweißfreien Filtrates, wie oben beschrieben, verascht. Weitere Behandlung wie oben. Man erhält ebenfalls den Rest-N-Gehalt in 1 ccm Serum.

Man kann die Destillation natürlich auch nach der Bangschen Methode (S. 90 ff.) und Titration mit Thiosulfat durchführen. Infolge der größeren verarbeiteten Blutmengen muß man dann die Vorlage mit 10 ccm n/100 H_2SO_4 mit Jodatzusatz beschicken. Die Ergebnisse sind ganz gleichwertig.

Der normale Wert des Rest-N beim nüchternen Menschen liegt bei 20 bis 40 mg in 100 ccm, je nach der Ernährung.

B. Halbmikrobestimmung im Vollblut.

Zur Enteiweißung dient nach Folin Wolframsäure, welche der Blutlösung zunächst als wolframsaures Natrium zugesetzt wird; durch Zusatz von Schwefelsäure wird die Wolframsäure in Freiheit gesetzt und die Koagulation bewirkt. Zur Enteiweißung nötige Reagentien: 1. 10%ige Lösung von Natriumwolframat, 2. 2/3 n-H_2SO_4 (hergestellt durch Mischen von 2 Vol. n-H_2SO_4 und 1 Vol. destilliertem Wasser).

Das der Vene entnommene Blut wird nach der S. 63 beschriebenen Methode durch Kaliumoxalat ungerinnbar gemacht. Man nimmt mit der Pipette 1 Vol. Blut (je nach der zur Verfügung stehenden Menge 3, 4 oder mehr ccm) und überführt sie in eine mit einem Glasstopfen versehene Flasche, welche ungefähr die 20fache Menge dieses Volumens fassen kann. In ein Reagensglas bringt man destilliertes Wasser herein und pipettiert nun aus diesem durch die gleiche Pipette 7mal dasselbe Volumen, wodurch gleichzeitig die Pipette ausgewaschen wird. Man fügt zu der Lösung nunmehr 1 Vol. der Wolframatlösung und mischt die klare hämolytische Blutlösung gut durch. Nun gibt man tropfenweise 1 Vol. der Schwefelsäure hinzu, wodurch infolge Freisetzung der Wolframsäure Koagulation

entsteht. Nach Aufsetzen des Stopfens wird 6—8 mal durch ruckweises Schütteln der Flasche gut durchgemischt. Man bereitet ein trockenes Faltenfilter vor, welches das ganze Volumen fassen kann, und filtriert durch dieses den ganzen Inhalt der Flasche in ein trockenes Gefäß, nachdem man zuerst mit einigen Tropfen der Mischung das Filter etwas angefeuchtet hat. Von dem Filtrat werden zur Reststickstoffbestimmung 10 ccm verwendet, die also 1 ccm Blut entsprechen. Die Veraschung, Destillation und Titration erfolgt in der oben angegebenen Weise. Die ebenfalls in gleicher Weise ausgeführte Berechnung ergibt die Menge Reststickstoff im Gesamtblut, die in der Regel etwas niedriger ausfällt als die des Serums.

Mikrobestimmung des Reststickstoffs nach Bang.

Prinzip: Aus dem in das Blättchen eingesaugten Blut wird der Nichteiweiß-Stickstoff mit Hilfe einer Molybdänsäurelösung extrahiert, die Extraktionsflüssigkeit verascht und das bei der Destillation übergetriebene Ammoniak jodometrisch bestimmt. Erforderliche Reagentien: 1. Phosphormolybdänsäurelösung. Darstellung: 10 g phosphormolybdänsaures Natrium und 10 g Natriumsulfat werden mit etwa 150 ccm Wasser und 15 Tropfen konzentrierter (33 %iger) Natronlauge in einer Porzellanschale zum Sieden erhitzt und 15 Minuten so gehalten. Nach dem Erkalten wird die Lösung in einen Meßkolben von 2 l überführt, mit ungefähr der gleichen Menge Wasser nachgespült und 30 ccm konzentrierte, reinste Schwefelsäure zugefügt, ferner 0,5 g reiner Traubenzucker. Es wird mit destilliertem Wasser zur Marke aufgefüllt und in einer gut schließenden Flasche aufbewahrt: ist Verunreinigung durch Ammoniak zu befürchten, so setzt man auf die Flasche einen mit verdünnter Schwefelsäure gefüllten Aufsatz. 2. Schwefelsäure, konzentriert, reinste. 3. Kupfersulfatlösung, 10 %ig. 4. Natronlauge, 33 %ig. 5. n/100 Schwefelsäure mit Jodatzusatz: 10 ccm n/10 H_2SO_4 und 40 ccm n/10 KJO_3-Lösung (diese Lösung enthält im Liter 21,4 g KJO_3) werden in einem 100 ccm Meßkolben bis zur Marke verdünnt. 6. Natriumthiosulfatlösung n/100, aus n/10 Lösung stets frisch zu bereiten.

7. Kaliumjodidlösung, 5 %ig; 8. 1 %ige Stärkelösung, hergestellt durch Verreiben von 1 g löslicher Stärke in ungefähr 5—10 ccm Wasser und Eingießen der Emulsion in gerade kochende, ungefähr 80 ccm Wasser und Auffüllen nach dem Erkalten auf 100 ccm.

In der S. 64 bzw. 66 angegebenen Weise werden mehrere Blättchen mit Blut beschickt und die Blutmenge notiert. Man überführt, nachdem das Blut leicht angetrocknet ist — hierfür sind ungefähr 5 Minuten nötig —, die Blättchen in saubere, trockene, vorher mit entsprechender Nummer bezeichnete Reagensgläser, deren Durchmesser etwas größer sein soll als die Schmalseite des Blättchens; wenn nötig, kann man auch dieses etwas einkniffen, damit es ohne Beschädigung bis auf den Boden des Reagenzglases fällt. Man gibt in jedes Reagensglas so viel Phosphormolybdänsäure (1), daß diese 2—3 mm über dem oberen Rande des Blättchens steht. Man läßt zur Extraktion mindestens eine Stunde stehen — es ist auch zulässig, ungefähr 20 Stunden stehenzulassen — und gießt dann die Extraktionsflüssigkeit vorsichtig in einen Mikrokjeldahlkolben ab, wobei darauf geachtet werden muß, daß sich nicht etwa Blutteilchen losgelöst haben. In diesem Falle ist die Bestimmung am besten zu verwerfen; steht jedoch nicht mehr genügend Material zur Verfügung, so kann man versuchen, von den Teilchen abzufiltrieren. Man spült das Reagensglas mit destilliertem Wasser nach, indem man bis zum Bedecken des Blättchens destilliertes Wasser in das Reagensglas einbringt und die abgegossene Lösung der anderen zufügt. Man gibt in den Kjeldahlkolben jetzt 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure und 3 Tropfen der Kupfersulfatlösung und verascht in üblicher Weise bis zum Eintritt einer grünlichen Färbung. Der Kolbeninhalt darf nicht trocken werden.

Die von Bang eingeführte Destillation unterscheidet sich prinzipiell von der vorherbeschriebenen dadurch, daß sie mit Hilfe von Wasserdampf vorgenommen wird. Den hierzu erforderlichen Apparat zeigt Abb. 13. A ist ein Dampfentwickler, gefüllt mit durch einige Tropfen H_2SO_4 (zur Bindung evt. NH_3) angesäuertem Wasser. Man benutzt als solchen einen Kochkolben aus Glas, in den zur

Verhinderung des Siedeverzugs einige Tonstückchen hereingeworfen sind. (Die Tonstückchen wirken durch ihre kapillaren Lufträume; sind sie längere Zeit verwendet worden, so hört ihre Wirksamkeit auf, sie sind dann entweder durch neue zu ersetzen oder an der Luft zuvor vollständig auszutrocknen.) Von dem Kochkolben geht außer einem kurzen Glasrohr mit aufgesetztem Schlauch, der durch eine Klemme verschlossen

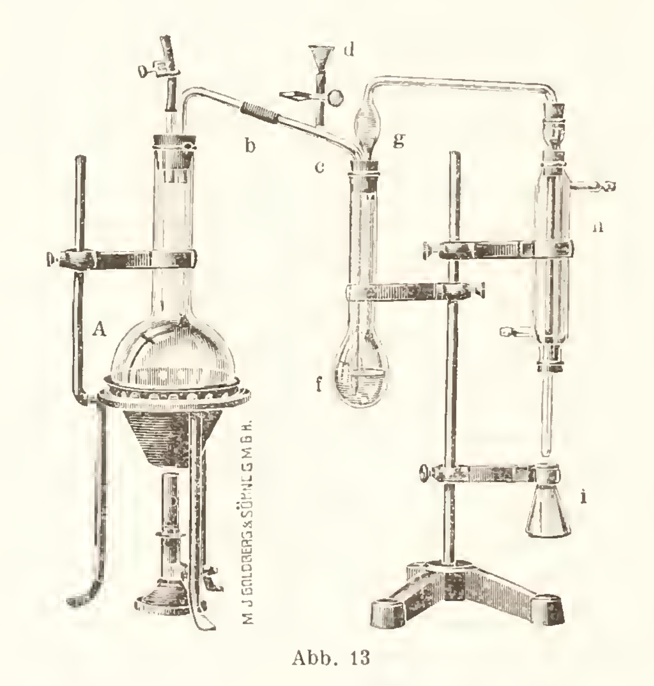


Abb. 13

ist, das Rohr b ab, welches durch Gummiverschluß Glas an Glas mit dem Rohre c verbunden ist, dessen absteigender Schenkel bis fast auf den Boden des Mikrokjeldahlkolbens reicht. An seinem etwas abfallenden Teil ist ein Glasrohr angeschmolzen, das durch einen kurzen Schlauch mit einem kleinen Trichter d verbunden ist. Durch eine Schlauchklemme kann dieses Rohr abgeklemmt werden. In den Mikrokjeldahlkolben f führt durch einen festsitzenden Gummistopfen[1]) außer dem Rohr c noch ein mit einem Kjeldahlaufsatz armiertes Rohr g zur Ableitung der Ammoniak-

[1]) Alter Gummi gibt etwas NH_3 ab, darum öfter erneuern!

dämpfe. Es wird am besten hufeisenförmig gebogen angewandt. An seinem unteren Ende ist Glas an Glas ein kleiner Kühler h angesetzt, dessen unteres Ende in ein kleines Gläschen i eintaucht. Die ganze Apparatur muß aus Jenaer Glas, besser noch aus Quarz hergestellt sein, mit Ausnahme natürlich des Kühlermantels. Bang empfiehlt ein silbernes Kühlerrohr mit Metallmantel. Die Destillation wird nun folgendermaßen vorgenommen: die Veraschungsflüssigkeit im Kjeldahlkolben wird in ungefähr 10 ccm destilliertem Wasser gelöst. Nachdem der Dampfentwickler mit Wasser gefüllt ist, wird, ohne daß vorläufig die Verbindung zwischen b und c hergestellt ist, der Kjeldahlkolben an seinen Platz gebracht, das Auffangegefäß i mit 2 ccm (in einzelnen Fällen genügt auch 1 ccm) n/100 Schwefelsäure gefüllt und so unter den Kühler gebracht, daß dessen Rohr in die Flüssigkeit eintaucht. Sollte dies aus irgendwelchen Gründen nicht möglich sein, muß die Flüssigkeit durch Zugabe von etwas destilliertem Wasser vermehrt werden. Nachdem alle Verschlüsse auf ihre Dichtigkeit geprüft sind, wird die Kühlung angestellt und die Flamme unter dem Dampfentwickler angesteckt. Sobald die Dampfentwicklung beginnt, wird die Verbindung zwischen b und c hergestellt, durch den Trichter d 4 ccm 33 %iger Natronlauge gegeben und nach dem Zusatz die Klemmschraube wieder geschlossen. Kurz darauf fängt die Übertreibung von Ammoniak an. Sobald Tropfen übergehen, kann das Gefäß i etwas gesenkt werden, so daß das Kühlerrohr nicht mehr eintaucht. Man läßt noch ungefähr 20 Tropfen übergehen, womit sämtlicher Ammoniak ausgetrieben ist, was zur Sicherheit mit Lackmuspapier geprüft wird. Man entfernt das Gläschen i, löst die Verbindung zwischen b und c und kann nun sofort eine weitere Destillation anschließen. Ist man mit den Destillationen fertig, so löscht man die Flamme, öffnet aber zu gleicher Zeit die Klemme, welche den zweiten Auslaß des Kochkolbens A verschließt, damit keine Flüssigkeit aus dem Kölbchen f in den Kochkolben zurücksteigt. Bei der Destillation ist darauf zu achten, daß die Dampfentwicklung nicht zu stark wird, da sonst trotz des Sicherheitsaufsatzes ein Herüberspritzen von

Laugeteilchen möglich ist, wodurch die titrimetrische Analyse unmöglich wird.

Die Titration erfolgt mit Thiosulfatlösung auf Grund der Gleichung $5KJ + KJO_3 + 6HCl = 6KCl + 3H_2O + 6J$ (HCl ist hier der Einfachheit der Berechnung wegen statt der in Wirklichkeit angewandten H_2SO_4 gesetzt). Sie beruht also darauf, daß durch die Schwefelsäure eine bestimmte Menge Jod in Freiheit gesetzt wird, die abhängig ist von der Menge der vorhandenen Säure, also geringer ist, wenn ein Teil der Säure durch Ammoniak abgesättigt worden ist. Durch 1 ccm n/100 H_2SO_4 wird genau soviel Jod in Freiheit gesetzt, als 1 ccm n/100 J-Lösung entspricht. Das freigesetzte Jod wird nach Zusatz von KJ und Stärke mit n/100 Thiosulfat titriert: 1 ccm dieser Thiosulfatlösung entspricht genau 1 ccm n/100 J-Lösung bzw. 1 ccm n/100 H_2SO_4. Das Jodat ist (Lösung 5) direkt der Schwefelsäure zugesetzt. Man gibt zum Destillat 1 ccm der KJ-Lösung, läßt 5 Minuten stehen und gibt dann 2 Tropfen Stärkelösung hinzu. Man titriert mit Natriumthiosulfatlösung aus einer in $^1/_{100}$ ccm geteilten Mikrobürette (s. S. 11), indem man als Unterlage eine weiße Platte oder ein weißes Papier benutzt, bis die blaue Farbe der Jodstärke gerade verschwunden ist. Tritt im Laufe von 3 Minuten neue Bläuung auf, so muß nochmals Thiosulfat bis zur Entfärbung zugefügt werden. Die verbrauchte Menge der Thiosulfatlösung gibt direkt die Menge der freigebliebenen, also nicht durch Ammoniak neutralisierten Schwefelsäure an. Die Differenz zwischen der vorgelegten Menge Schwefelsäure und der durch die Thiosulfattitration ermittelten gibt die Menge der durch Ammoniak gebundenen an. Durch Multiplikation dieser Zahl mit 0,14 erhält man die Menge Milligramm Rest-N in der angewandten Flüssigkeitsmenge.

Beispiel: Gewicht des Blättchens ohne Blut 75 mg, mit Blut 185 mg, Gewicht des Blutes 110 mg. Bei der Titration vorgelegt 1 ccm n/100 H_2SO_4, zum Zurücktitrieren verbraucht 0,35 ccm Thiosulfat, durch NH_3 gesättigte n/100 H_2SO_4 also 0,65 ccm. Rest-N in der angewandten Menge (110 mg) $0,65 \cdot 0,14 = 0,091$ mg N, also in 100 mg 0,083 mg oder in 100 g Blut 83 mg Rest-N.

Alle vier für die Reststickstoffbestimmung angegebenen Methoden arbeiten zuverlässig. Die Bangsche Methode ist in der Ausführung etwas schwieriger und bei den kleinen Mengen ist besonders genaues Arbeiten erforderlich. Bei einiger Übung sind die Ergebnisse durchaus genaue. Bei allen Methoden, vor allem der Bangschen, sind Leerbestimmungen nötig, deren Resultate bei der Berechnung nicht vernachlässigt werden dürfen. Auch das zugesetzte Wasser kann NH_3 enthalten, es ist doppelt zu destillieren und gegen NH_3-Aufnahme geschützt aufzubewahren.

Der Reststickstoff des normalen Blutes nüchterner Menschen beträgt 20—30 mg $^0/_0$.

Bestimmung des Gesamtstickstoffs.

Man verwendet bei den verhältnismäßig großen Mengen Gesamtstickstoff im Blut zweckmäßig eine kombinierte Methode. Man saugt in besonders dünne, stickstofffreie Löschpapierblättchen ungefähr 20—25 mg Blut auf, überführt das Blättchen nach dem Wägen sofort in einen Kjeldahlkolben und gibt 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 3 Tropfen Kupfersulfat und, zwecks schnellerer Veraschung, 2 ccm einer 4 $^0/_0$igen Kaliumpermanganatlösung dazu. Man verascht wie gewöhnlich und destilliert nach einer der oben beschriebenen Methoden. Bei dem verhältnismäßig großen N-Gehalt des Gesamtblutes dürfte die S. 44 beschriebene Methode (Erhitzung und n/50 Lösungen) die einfachste und empfehlenswerteste sein. Die Berechnung erfolgt in üblicher Weise.

Bestimmung des Harnstoffs.

A. Halbmikromethode.

Prinzip: Das eiweißfreie Filtrat des Blutes wird mit Urease versetzt und das gebildete Ammoniak in gewöhnlicher Weise bestimmt.

Vollblut wird in der (S. 89) angegebenen Weise mit Wolframsäure, Serum auf die gleiche Weise enteiweißt. Zur Harnstoffbestimmung dient ein aliquoter Teil, vom

Vollblutfiltrat 10 ccm, entsprechend 1 ccm Blut. Zur Überführung des Harnstoffs in Ammoniak wird eine Messerspitze Urease oder 2 ccm einer Ureaselösung zugefügt, die folgendermaßen hergestellt wird: in eine Flasche von 200 ccm Inhalt werden 3 g Permutit (Bezugsquelle: Permutitgesellschaft, Berlin) fein pulverisiert, eingefüllt und diese einmal mit ungefähr 100 ccm einer 2%igen Essigsäure gut durchgeschüttelt. Nach Absetzen des Permutits wird die Essigsäure abgegossen und in gleicher Weise das Pulver 2mal mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Nach Abgießen des letzten Spülwassers gibt man in die Flasche 5 g feingepulvertes Sojabohnenmehl oder Jackbeanmehl und 100 ccm 30%igen Alkohol (hergestellt aus 35 ccm 95%igem Alkohol und 65 ccm Wasser). Man schüttelt $^1/_4$ Stunde gut durch, läßt absetzen und filtriert. Die Lösung hält sich bei Zimmertemperatur ungefähr 1 Woche wirksam, im Eisschrank 3—5 Wochen. Außerdem gibt man in das Reagenzglas bzw. das Kjeldahlkölbchen 3 ccm Phosphatmischung, bestehend aus 13,6 g KH_2PO_4 und 83,5 g $Na_2HPO_4 + 12\,H_2O$ in 500 ccm Wasser und stellt das Reagenzglas während 15 Minuten in ein Wasserbad von 50—55 Grad ein. Man destilliert das gebildete Ammoniak in dem S. 36 beschriebenen Apparat über unter Vorlage von 5 ccm n 50 H_2SO_4. Die Temperatur kann hierbei auf 65—70° gesteigert werden. Zur Verhinderung des Schäumens wurden in das Destillationsgefäß 2 ccm Paraffinum liquidum und 6 Tropfen Oktylalkohol gegeben. Tritt während der Destillation erneut Schäumen auf, so fügt man durch den Trichter einige Tropfen Oktylalkohol erneut zu. Titration ebenfalls in oben beschriebener Weise mit Methylrot als Indikator. Durch Multiplikation der Differenz zwischen vorgelegter und zurücktitrierter Säure mit 0,28 erhält man die Milligramm Harnstoff-N in der angewandten Blutmenge in Milligramm, durch Multiplikation dieser Zahl mit 2,143 die Menge Harnstoff. Multiplikation der Differenz mit 0,60 ergibt sinngemäß sofort die Harnstoffmenge in Milligramm.

Bei Anwendung von Oktylalkohol ist eine Titration mit Thiosulfat nicht möglich.

B. Mikromethode nach Ivar Bang.

Ein Blättchen wird in der S. 64—66 angegebenen Weise mit Blut beschickt, gewogen und sofort in ein trockenes Reagenzglas überführt. Nach Angabe von Bang darf die Menge des Blutes 130 mg auf keinen Fall übersteigen. Man gibt in das Reagenzglas so viel einer Mischung gleicher Teile von absolutem Alkohol und Äther, daß die Flüssigkeit ungefähr $^1/_2$ cm über dem Blättchen steht. Man verschließt mit einem gut schließenden Stopfen und läßt über Nacht, d. h. ca. 20 Stunden, stehen. Dann gießt man den Äther-Alkohol in einen Mikrokjeldahlkolben ab, wäscht ungefähr mit derselben Menge des Gemisches nach und fügt diese Lösung zur vorigen. Man gibt sofort ca. 1 ccm Wasser und 1 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zu und läßt den Äther-Alkohol auf einem elektrischen Heizapparat oder im Wasserbad (Achtung, Feuersgefahr!) abdunsten. Ist der Geruch nach Äther vollständig verschwunden und hat die Lösung nur noch einen schwachen Alkoholgeruch, so nimmt man den Kolben aus dem Wasserbad heraus, trocknet ihn außen ab und verascht in üblicher Weise nach Zusatz von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 3 Tropfen 10%iger Kupfersulfatlösung. Destillation und Titration erfolgt in der bei der Bangschen Reststickstoffmethode (S. 91) angegebenen Art. Man erhält den Harnstoff-N in Milligramm, aus dem man durch Multiplikation mit 2,143 den Harnstoffgehalt selbst ermittelt.

Mikrobestimmung der Aminosäurefraktion nach Bang.

Durch Extraktion mit der Phosphormolybdänsäurelösung (s. bei Reststickstoff) gehen aus den bereits mit Äther-Alkohlol extrahierten Plättchen die übrigen N-haltigen Extraktivstoffe, im wesentlichen die Aminosäuren, in Lösung. Das zur Harnstoffbestimmung bereits extrahierte Plättchen wird mit einem kleinen Platin- oder Glashäkchen aus dem Reagensglas herausgenommen, mit etwas Alkohol-Äther abgewaschen (dieser kommt zur Ü-Fraktion) und nach Verdunstung dieser in ein anderes sauberes Reagenzgläschen überführt. Man gibt,

wie bei der Rest-N-Bestimmung beschrieben, Phosphormolybdänsäurelösung zu, läßt mindestens eine Stunde, besser längere Zeit, extrahieren und verfährt wie oben angegeben: die Lösung wird in einen Kjeldahlkolben abgegossen, mit der Extraktionsflüssigkeit nachgespült, wie üblich verascht und destilliert. Man erhält so den N der N-haltigen Extraktivstoffe außer Harnstoff.

Die Methode erlaubt, wie sich aus dem gesagten ergibt, nur eine annähernde Bestimmung der Aminosäuren. Für genauere Versuche ist folgendes Verfahren vorzuziehen.

Bestimmung der Aminosäuren.

Prinzip: Das gleiche wie bei der Bestimmung im Harn S. 49 beschrieben.

Gebrauchte Reagentien: 1. Natriumkarbonatlösung: 50 ccm einer fast gesättigten Lösung von Natriumkarbonat werden auf 500 ccm verdünnt. Die Lösung muß jetzt so eingestellt werden, daß 8,5 ccm mit Methylrot als Indikator 20 ccm n/10 HCl entsprechen. Zu diesem Zweck werden 20 ccm n/10 HCl in einen Kolben pipettiert, einige Tropfen Methylrot zugegeben und von der verdünnten Natriumkarbonatlösung so lange zugegeben, bis die rote Färbung gerade in gelb umschlägt. Je nach der verbrauchten Menge ist die Lösung zu verdünnen. Wurden z. B nur 7,5 ccm Natriumkarbonatlösung verbraucht, so ist die Verdünnung so vorzunehmen, daß 7,5 ccm mit destilliertem Wasser auf 8,5 ccm zu verdünnen sind. Will man z. B. 500 ccm dieser richtig verdünnten Lösung herstellen, so geschieht das nach der Formel $7{,}5 : 8{,}5 = x : 500$, woraus sich berechnet $x = \frac{500 \cdot 7{,}5}{8{,}5}$, oder 441. Es müssen also 441 ccm der zunächst hergestellten verdünnten Natriumkarbonatlösung auf 500 im Meßkolben aufgefüllt werden. 2. Essigsäureazetatlösung: 100 ccm $50^0/_0$ige Essigsäure werden mit der gleichen Menge einer $5^0/_0$igen Lösung von Natriumazetat vermischt. 3. Thiosulfatlösung $4^0/_0$ig in Wasser. 4. Glykokoll-Vergleichslösung: 70 ccm der S. 49 beschriebenen

Vergleichslösung für Harn werden mit n/10 Salzsäure auf 100 aufgefüllt. 5. Reagenzlösung: frisch bereitete Lösung von 0,1 g Naphthochinonreagens in 20 ccm Wasser. 6. 7. die S. 89 zur Enteiweißung angegebenen Reagentien: wolframsaures Natrium 10%ig und 2/3 n-Schwefelsäure.

Von der nach S. 89 gewonnenen eiweißfreien Blutlösung (wenn keine andere Bestimmung ausgeführt wird, genügt, 2 ccm Blut bzw. Serum zu enteiweißen) werden 10 ccm in ein großes Jenaer Reagenzglas einpipettiert, das eine Marke bei 25 trägt. In ein zweites gleiches Glas wird 1 ccm der Vergleichslösung (4) einpipettiert und 8 ccm destilliertes Wasser zugefügt. In beide Gläser kommt nun 1 Tropfen einer 0,25%igen Phenolphthaleinlösung, in das Röhrchen mit der Vergleichslösung sodann 1 ccm Natriumkarbonatlösung (1), wodurch der Inhalt des Glases sich rötlich färbt. Man gibt nun in das Röhrchen mit der Versuchslösung tropfenweise Natriumkarbonatlösung zu, bis die Färbung der der Kontrollösung entspricht, wozu im allgemeinen ungefähr 6 Tropfen, gelegentlich etwas mehr oder weniger, gebraucht werden. Nun wird in jedes Glas 2 ccm der Reagenzlösung (5) zugefügt, leicht gemischt und die Proben mindestens 16 Stunden an einem dunklen Ort stehengelassen. Am nächsten Tag wird in jedes Röhrchen zunächst 2 ccm Essigsäureazetatgemisch (2) unter leichtem Mischen zugefügt und dann ebenfalls in jedes Röhrchen je 2 ccm der Thiosulfatlösung (3) zugegeben. Es wird bis zur Marke 25 mit destilliertem Wasser ergänzt, gut vermischt und sofort im Kolorimeter verglichen.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß die Kontrolle 0,07 mg N als Amino-N enthält. Die in der angewandten Menge Blutfiltrat (10 ccm entsprechen 1 ccm Blut) enthaltene Amino-N-Menge berechnet sich nach der kolorimetrischen Formel, also zu $c = 0{,}07 \cdot \frac{s_1}{s}$, wobei s_1 die Schichtdicke der Vergleichslösung, s die Schichtdicke der Versuchslösung bei Farbengleichheit bedeutet. Die Kolorimetrierung wird erleichtert durch Vorschaltung eines Kobaltglases.

Beispiel: Bei Farbengleichheit sei die Schichtdicke der Vergleichslösung 25, die der Versuchslösung 20. Der Gehalt an Amino-N in der angewandten Blutmenge 1 ccm) ist $0{,}07 \cdot \frac{25}{20}$ mg = 0,0875 mg, in 100 ccm also 8,75 mg Amino-Stickstoff.

Der Amino-Stickstoff beträgt in normalem Blut 6—8 mg %.

Bestimmung des Ammoniaks.

5 ccm Blut, die nach der oben (s. S. 63) angegebenen Methode mit Kaliumoxalat ungerinnbar gemacht worden sind, werden sofort in ein 25 ccm Meßkölbchen eingefüllt, 1 Tropfen ungefähr N-Natronlauge zugegeben und 95 %iger Alkohol bis zur Marke zugefügt. Man mischt durch und filtriert nach kurzem Stehen durch ein trockenes Faltenfilter in ein trockenes Gefäß. 20 ccm der alkoholischen, eiweißfreien Lösung — kann soviel nicht erhalten werden, nimmt man etwas weniger Filtrat, berücksichtigt es aber bei der Berechnung! — werden in das große Jenaer Reagensglas A des Destillationsapparates (S. 36) eingefüllt und 1 Tropfen Phenolphthalein zugefügt. Das Auffanggefäß F wird mit 1 ccm n/100 H_2SO_4 beschickt und 5 ccm Wasser zugegeben, so daß das Rohr g gut eintaucht. Nachdem die Luftpumpe angedreht worden ist, wird durch den Trichter c 1—2 ccm 20 %ige Sodalösung (Rotfärbung!) und etwas Paraffinöl zugegeben. Man destilliert bei einer Temperatur des Wasserbades von 40—45 Grad und gutem Saugen 15 Minuten, entfernt dann das Auffangegefäß und tiriert nach Zusatz von Methylrotlösung mit n/100 Natronlauge. Die Differenz zwischen vorgelegter Schwefelsäure und zum Zurücktitrieren gebrauchter Natronlauge mal 0,17 gibt die Ammoniakmenge in der angewandten Lösung an.

Beispiel: Vorgelegt 1 ccm n/100 H_2SO_4, zum Zurücktitrieren 0,72 ccm Natronlauge: Ammoniakmenge $0{,}28 \cdot 0{,}17 = 0{,}0476$ mg in 20 ccm Lösung oder 4 ccm Blut, 1,19 mg in 100 ccm Blut.

Bestimmung des Zuckers nach Bang.

Prinzip: Durch den Blutzucker (oder richtiger die reduzierenden Substanzen des Blutes) wird Kupfersulfatlösung reduziert: das gebildete Kupferoxydul wirkt auf Jodsäure und reduziert diese, indem sich wiederum Kupferoxydstufe bildet. Die Menge des reduzierten Jodates wird titrimetrisch mit Thiosulfat ermittelt.

Erforderliche Reagentien: 1. Salzlösung. In einen Meßkolben von 2 l werden 1360 ccm gesättigte Chlorkaliumlösung eingebracht, dazu 0,8 g Kupfersulfat. Andererseits werden 2 g Uranylazetat in 200 ccm Wasser gelöst, 1,2 ccm konzentrierte (30%ige) Salzsäure zugegeben und diese Mischung ebenfalls in den Meßkolben eingefüllt. Mit destilliertem Wasser wird auf 2000 ccm aufgefüllt. 2. Jodatlösung. 0,3567 g Kaliumjodat (KJO_3) werden in einem Meßkolben von 1 l in Wasser aufgelöst, 10 ccm 20%ige Schwefelsäure (s. 4) zugegeben und auf 1000 ccm aufgefüllt. 3. Alkalilösung. 75 g Kaliumkarbonat normal (K_2CO_3) und 20 g weinsaures Kaliumnatrium (Seignettesalz) werden in Wasser gelöst und das Volumen auf 1000 gebracht. 4. Schwefelsäure 20%ig (aus 80 ccm Wasser und 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure). 5. 5%ige Kaliumjodid-(KJ-)Lösung. 6. 1%ige Stärkelösung (s. S. 91). 7. $n/_{100}$ Thiosulfatlösung.

Man stellt sich bereit: 1 Gefäß (Reagensglas oder Kölbchen mit Salzlösung (1), darin eine Pipette von 6,5 ccm Inhalt; ein Gefäß mit Jodatlösung (2), dazu eine genaue Pipette von 2 ccm; eine Bürette mit Alkalilösung, ein Gefäß mit Schwefelsäure, dazu eine 2 ccm Pipette. Jodkalilösung und Stärkelösung hat man für den augenblicklichen Gebrauch zweckmäßig in kleinen Tropfflaschen.

Man beschickt, wie oben beschrieben, mehrere Blättchen (für jede Bestimmung mindestens 2) mit Blut und bringt sie unmittelbar nach dem Wägen in trockene Reagenzgläser. In jedes Glas gibt man 6,5 ccm der Salzlösung (1) und läßt mindestens ½ Stunde lang extrahieren. Längeres Verweilen bis zu 24 Stunden schadet

nichts, doch werden die Zuckerwerte etwas niedriger. Man gießt dann die Extraktionsflüssigkeit in Jenaer Kölbchen (Kochsche Form) mit ziemlich weitem Halse von ungefähr 100 ccm Fassungsraum ab, bringt in das Reagensglas zum Nachspülen nochmals genau 6,5 ccm Salzlösung und gießt auch diese in das entsprechende Erlenmeyerkölbchen hinein. Man vergesse nicht, die Kolben zu markieren. Wenn nur wenig Zucker erwartet wird,

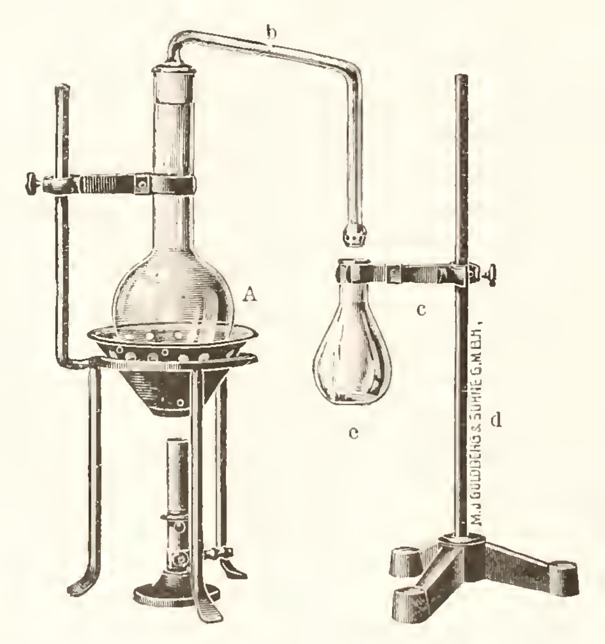


Abb. 14.

kann man die Extraktionsflüssigkeit aus 2 Reagenzgläsern, in deren jedes ein Blättchen hereingetan worden war, in ein Kölbchen zusammengießen und das Nachspülen unterlassen. Man hat dann in dem Kölbchen ebenfalls 13 ccm Lösung und kann nun weiter wie für die zuerst beschriebene Methode verfahren. Man fügt nun je 2 ccm Jodatlösung (2) (sehr genau!) und Alkalilösung (3) zu und nimmt die Reduktion vor. Der hierzu erforderliche Apparat besteht aus einem Kochkolben (Dampfentwickler) A, der mit einem eingeschliffenen Glasstopfen verschlossen ist (s. Abb. 14), der eingeschmolzen ein zweimal gebogenes Rohr b trägt. Der zweite senkrechte

Schenkel muß ungefähr 3—4 cm länger sein als die Höhe der benutzten Kochschen Kölbchen beträgt. Dieser Schenkel trägt an seinem unteren Ende eine kleine Kugel, die seitlich in gleichen Zwischenräumen 3 Löcher enthält. Wird im Dampfentwickler Dampf entwickelt, so geht er durch das Rohr b durch und entweicht in der angeschmolzenen Kugel durch die drei eingeblasenen Löcher. Zur Vermeidung des Stoßens gibt man trockene Tonstückchen in den Kochkolben A herein. Das Erlenmeyerkölbchen e mit der Versuchsflüssigkeit wird zweckmäßig mit einer Klammer c eingeklammert, die auf einem Stativ d leicht herauf- und heruntergeschoben werden kann. Vor Beginn des Versuches wird der Dampfentwickler angeheizt: sobald die Dampfentwicklung regelmäßig geworden ist, wird das Erlenmeyerkölbchen, das bis dahin beiseite gestanden hat, mit Hilfe der Klammer schnell hochgeschoben, bis das Rohr b so tief eintaucht, daß der kugelige Ansatz ganz von der Flüssigkeit bedeckt ist. Die Zeit wird sofort, am besten mit Hilfe einer Stoppuhr oder Sanduhr markiert. Durch den einströmenden Dampf wird der Inhalt des Kölbchens in ungefähr 40 Sekunden zum Sieden erhitzt und bleibt dann im dauernden Kochen, das genau 4 Minuten nach dem Einführen (nicht nach Beginn des Siedens der Versuchsflüssigkeit!) unterbrochen wird. Während des Kochens füllt man die Pipette mit 20%iger Schwefelsäure und stellt diese 5 Sekunden vor dem Ablauf der 4 Minuten mit der Füllung in die Versuchsflüssigkeit herein. Das Unterbrechen erfolgt außer durch diese H_2SO_4-Zugabe durch schnelles Fortziehen des Erlenmeyerkölbchens vom Dampfentwickler, indem man es mit Hilfe der Klammer schnell herunterläßt. Man läßt den Inhalt des Kölbchens fünf Minuten erkalten, gibt 20 ccm destilliertes Wasser zu und kühlt dann eine Minute unter fließendem Wasser ab. Die Titration erfolgt mit n/100 Thiosulfatlösung mit Hilfe der Mikrobürette (s. S. 11). Man gibt zur Lösung 10 Tropfen Jodkaliumlösung (5) und 3 Tropfen Stärkelösung (6) und titriert auf einer weißen Unterlage, bis die Blaufärbung gerade verschwunden ist und innerhalb 3 Minuten nicht wiederkehrt.

Andererseits muß ein Leerversuch angestellt werden, in dem man zu gleicher Zeit auch das etwaige jodbindende Vermögen der anderen angewandten Reagentien feststellt. Dieser Versuch wird genau so angestellt wie der Vollversuch. Man nimmt nur statt der mit Blut beschickten Plättchen gewöhnliche leere. Dieser Versuch braucht nicht für jede Bestimmung neu ausgeführt zu werden, er muß jedoch mindestens an jedem Versuchstage in zwei Proben gemacht werden, wobei naturgemäß Bedingung ist, daß für alle Versuche dieses Tages dieselben Lösungen, auch die gleiche Thiosulfatlösung, angewandt wird. Stimmen die Werte nicht gut überein, muß wiederholt werden, da ja der erhaltene Wert grundlegend für die Berechnung ist.

Berechnung: Da bei der Titration mit Thiosulfalt die freie Jodsäure bestimmt wird, muß der bei der Leerbestimmung erhaltene Wert ein höherer sein als bei der Vollbestimmung. Man subtrahiert diesen letzteren Wert von dem der Leerbestimmung und dividiert die so erhaltene Zahl durch 2,8. Diese Zahl leitet sich daher, daß unter den angegebenen Versuchsbedingungen 2,8 ccm n/100 Thiosulfatlösung 1 mg Zucker entsprechen. Man erhält auf diese Weise die Menge Traubenzucker in der Versuchslösung in Milligramm, unter Berücksichtigung des Gewichtes des angewandten Blutes die Blutzuckermenge in 100 g.

Beispiel: Die Leerbestimmung habe ergeben 1,92 ccm n/100 Thiosulfat, die Vollbestimmung 1,65 ccm Thiosulfat. Die Differenz beträgt 0,27 ccm Thiosulfat. $0,27 : 2,8 = 0,0964$; die angewandte Blutmenge enthielt also 0,0964 mg Blutzucker. Waren 86 mg Blut abgewogen, so ergibt sich aus der Gleichung

$$86 : 0,0964 = 100 : x$$

der Zuckergehalt in 100 mg Blut zu 0,112 mg, der Zuckergehalt in 100 g Blut also zu 0,112 g.

Der Zuckergehalt des normalen nüchternen Blutes beträgt 0,08—0,1 $^0/_0$.

Bestimmung des Blutzuckers nach Hagedorn und Jensen[1]).

Prinzip: Das Blut wird durch eine kolloidale Lösung von Zinkhydroxyd enteiweißt, das klare Filtrat wird mit Ferrizyankalium behandelt und das nichtgebrauchte durch Thiosulfat zurücktitriert. Die Reaktion, nach welcher die Umsetzung erfolgt, ist

$$2\,H_3\,Fe\,Cy_6 + 2HJ = 2H_4\,Fe\,Cy_6 + J_2.$$

Gebrauchte Reagentien: 1. Zinksulfatlösung: Zinksulfat 45 g, in Wasser gelöst, auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösung wird zum Gebrauch auf das 100fache verdünnt. 2. Kaliumferrizyanidlösung: 1,65 g Kaliumferrizyanid und 10,6 ausgeglühtes Natriumkarbonat werden in Wasser gelöst und im Meßkolben auf 1000 aufgefüllt. Lösung in brauner Flasche aufbewahren. 3. Zinksulfat-Kochsalzlösung: 10 g Zinksulfat und 50 g NaCl werden in Wasser gelöst und auf 160 ccm aufgefüllt. 4. Kaliumjodidlösung, 12,5 g KJ werden mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt (in brauner Flasche aufheben). Zum Gebrauch werden 40 Teile (3) mit 10 Teilen (4) gemischt. Die in dunkler Flasche aufzubewahrende Lösung hält sich nur kurze Zeit: mindestens wöchentlich frisch herstellen! 5. Eisessiglösung: 3 ccm Eisessig werden mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. 6. Stärkelösung: 1 g lösliche Stärke wird unter leichtem Erwärmen in ungefähr 5 ccm Wasser gelöst und mit gesättigter NaCl-Lösung auf 100 aufgefüllt. 7. Natriumthiosulfatlösung n/200, hergestellt durch Verdünnen von 5 ccm n/10 Thiosulfat auf 100. 8. Kaliumjodatlösung: 0,3566 g $KJ\,O_3$ werden in Wasser gelöst und im Meßkolben auf 2000 aufgefüllt. Letztere Lösung dient zur Einstellung des Titers der Lösung (7). Diese Kontrolle ist stets vorzunehmen, so oft eine neue Thiosulfatlösung gebraucht wird, mindestens aber jede Woche. Diese Titerstellung erfolgt einfach so, daß 2 ccm Jodatlösung (8) mit 2 ccm Essigsäure (5) und 2 Tropfen Stärke (6) versetzt werden und die bis zum Verschwinden der Blaufärbung nötige Menge festgestellt wird. 9. NaOH n/10.

[1]) Bioch. Zs. Bd. 135 (1923).

Alle Reagentien sind darauf zu prüfen, daß sie eisenfrei sind, sonst sind sie zu verwerfen.

Zur Enteiweißung der Blutproben werden ebensoviel Reagensgläser aus Jenaer Glas von ungefähr 15 mm Durchmesser und 120 mm Höhe (es können auch andere Formate verwandt werden) mit je 1 ccm n/10 NaOH beschickt und dazu 5 ccm der auf das 100fache verdünnten Grundlösung (1) zugegeben. Es entsteht eine kolloidale Lösung von Zinkhydrat. Ein oder besser zwei Gläschen werden als Kontrollen in der gleichen Weise behandelt. Mit einer Pipette von 0,1 ccm wird aus der Fingerbeere oder aus dem Ohrläppchen 0,1 ccm Blut entnommen, die Pipette von außem anhaftendem Blut gesäubert und der Inhalt in die kolloidale Zinklösung ausgeblasen. Man spült die Pipette mit der im Reagensgläschen befindlichen Mischung noch 2mal aus und bläst sie leer. Man stellt nunmehr sämtliche mit Blut beschickten Röhrchen ebenso wie die Kontrollen auf 3 Minuten in ein siedendes Wasserbad. Inzwischen hat man soviel Präparatengläser von ungefähr 30 mm Durchmesser und 100 mm Höhe bereitgestellt, wie der Menge der Proben einschließlich Kontrollen entspricht. Diese Gläschen stehen zweckmäßig in einem dazu angefertigten Gestell, das man späterhin zusammen mit den Gläschen in ein Wasserbad stellen kann. Auf die mit den gleichen Zahlen wie die Reagenzgläser mit den Proben zu numerierenden Gläschen kommt ein kleiner Trichter von ungefähr 4 cm Durchmesser, der einen kleinen Bausch angefeuchtete Watte enthält. Nachdem die Reagenzgläser die oben genannten 3 Minuten erhitzt worden sind, gießt man ihren Inhalt auf das dazugehörige Filter, worauf ein ganz klares Filtrat resultieren muß. Man wäscht die Reagensgläser noch zweimal mit je 3 ccm Wasser gut aus und gießt diese ebenfalls auf das Filter. Man läßt gut abtropfen und entfernt die Trichter. Nunmehr wird in jedes Glas einschließlich der Kontrollen 2 ccm Ferrizyanidlösung (2) — sehr genau abzumessen! zugefügt und das Gestell mit den Gläschen 15 Minuten in ein kochendes Wasserbad eingebracht. Man läßt abkühlen — die Proben können jetzt auch längere Zeit

stehenbleiben — und fügt nun zu jeder Probe 2 ccm der Zinksulfat-Kaliumjodidlösung (Mischung aus 3 und 4) darauf 2 ccm Essiglösung (5) und 2 Tropfen Stärkelösung (6). Man titriert mit der Thiosulfatlösung aus einer Mikrobürette in üblicher Weise bis zum Verschwinden der blauen Farbe, wobei man das Gläschen auf eine weiße Unterlage stellt.

Zur Berechnung muß man kennen: 1. die verbrauchte Thiosulfatlösung, a) für die Blutprobe, b) für die Kontrolle; 2. den Titer der Thiosulfatlösung. Hagedorn und Jensen haben eine Tabelle angegeben, aus welche die Glukosewerte ohne weiteres, wenn man diese Zahlen kennt, zu entnehmen sind.

ccm n/200 Thiosulfat = mg Glukose in 100 ccm Blut

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	099	097	095	093	092	090
1,5	088	086	084	083	081	079	077	075	074	072
1,6	070	068	066	065	063	061	059	057	056	054
1,7	052	050	048	047	045	043	041	039	038	036
1,8	034	032	031	029	027	025	024	022	020	019
1,9	017	015	014	012	010	008	007	005	003	002

Die Zuckermenge ergibt sich nun daraus, daß man unter Berücksichtigung des durch die Probe mit Kaliumjodat erhaltenen Titers aus der Tabelle direkt entnimmt,

welcher Traubenzuckermenge die im Vollversuche mit Blut verbrauchte Thiosulfatmenge entspricht. Von der so erhaltenen Zahl wird die fiktive Menge Traubenzucker abgezogen, welche dem Verbrauch der Thiosulfatlösung im Leerversuch ohne Blut entsprechen würde. Die Differenz ergibt direkt die mg Glukose in 100 ccm Blut.

Beispiel: Die Einstellung der Thiosulfatlösung mit der Jodatlösung habe ergeben, daß für 2 ccm Jodatlösung 2,04 ccm Thiosulfatlösung verbraucht worden seien. Die Thiosulfatlösung ist demnach etwas zu schwach und man muß, um richtige Werte zu erhalten, die beim Zuckerversuch verbrauchte Thiosulfatmenge mit $\frac{2,04}{2,00} = 1,02$ multiplizieren.

Es sei verbraucht worden im Vollversuch 0,64 ccm. Da diese Zahl mit 1,02 (dem Titer der Thiosulfatlösung) zu multiplizieren ist, ergibt sich als wahrer Verbrauch von Thiosulfat 0,65 ccm. Aus der Tabelle wird der dazu gehörige Wert mit 241 mg abgelesen. Im Leerversuch seien verbraucht worden 1,86 ccm; diese Zahl muß wiederum mit 1,02 multipliziert werden, was 1,90 ccm ergibt. Der dazu gehörige Zuckerwert der Tabelle ist 17 mg Traubenzucker. Die Differenz 241 minus 17 ergibt einen Gehalt von 224 mg Traubenzucker in 100 ccm Blut oder 0,224 %. Der besondere Vorteil dieser Methode ist, daß man keine Torsionswage braucht. Die Ergebnisse sind denen des Bangschen Verfahrens durchaus gleichwertig.

Bestimmung des Blutzuckers nach Folin-Wu.

Prinzip: Blutfiltrat wird zugleich mit einer Standardlösung mit Kupfertartratlösung gekocht: das ausgeschiedene Kupferoxydul wirkt unter Reduktion auf eine Phosphormolybdänsäurelösung. Die entstehenden Blaufärbungen werden kolorimetrisch verglichen.

Erforderliche Reagentien: Zur Enteiweißung die Lösungen nach Folin-Wu. Ferner 1. alkalische Kupferlösung. 40 g wasserfreies Natriumkarbonat wird in einem Meßkolben von 1 l in ca. 400 ccm Wasser gelöst. Dazu

wird 4,5 g kristallisiertes Kupfersulfat und 7,5 Weinsäure zugefügt und nach Lösung auf 1 l aufgefüllt. 2. Phosphormolybdänsäurelösung. In einem Jenaer Kolben von ca. 1 l werden 35 g Molybdänsäure und 5 g Natriumwolframat mit 200 ccm 10%iger Natronlauge und 200 ccm Wasser versetzt und die Lösung 30 Minuten lang stark gekocht. Nach dem Abkühlen wird auf ca. 350 ccm aufgefüllt, 125 ccm sirupöse Phosphorsäure (spez. Gew. 1,71) zugegeben und auf 500 ccm aufgefüllt. 3. Vergleichslösung. a) Stammlösung: 1,1 g reiner Traubenzucker werden in 100 g Wasser gelöst, der Gehalt der Lösung nach 24 Stunden durch Polarisation genau festgestellt, so viel Wasser zugefügt, daß die Lösung genau 1%ig ist und unter Zugabe einiger Tropfen Toluol (nicht von Chloroform, da dieses die Reduktionsfähigkeit beeinflußt!) in verschlossener Flasche kalt aufbewahrt. b) Standardlösung I für schwächere Konzentrationen: 5 ccm der Stammlösung werden mit Wasser auf 500 ccm verdünnt. Die Lösung enthält in 100 ccm 10 mg Traubenzucker. c) Standardlösung II: 5 ccm Stammlösung werden im Meßkolben auf 250 ccm aufgefüllt und ebenso aufbewahrt. Die Lösung enthält in 100 ccm 20 mg Glukose.

25
4

Abb. 15.

Für die Bestimmung gebraucht man Zuckerreagenzgläser nach Folin (Abb. 15), welche eine Marke bei 4 ccm und 25 ccm besitzen. Man pipettiert in das eine Röhrchen 2 ccm Blutfiltrat, in das andere 2 ccm Standardlösung (im allgemeinen Standard 1, nur bei sehr hohen Zuckermengen Standard 2) und gibt ferner in jedes Glas 2 ccm Kupferlösung. Man setzt beide in ein kochendes Wasserbad (großes Becherglas) und beläßt sie darin 6 Minuten. Man überführt dann in ein Glas mit kaltem Wasser, läßt die Gläser dort 3 Minuten und gibt nun in jedes 2 ccm Phosphormolybdänlösung, worauf sich unter Aufschäumen Blaufärbung entwickelt. Sobald die Gasentwicklung beendigt ist, füllt man beide Röhrchen mit Wasser bis zur 25-ccm-Marke auf, mischt die Lösungen und vergleicht kolorimetrisch.

Berechnung: Bei Anwendung von Standardlösung I ergibt sich der Zuckergehalt in 100 ccm Blutfiltrat zu $c = 10$ mg multipliziert mit $\frac{s_1}{s}$, bei Anwendung der stärkeren Standardlösung zu $20 \cdot \frac{s_1}{s}$ mg. Da das Blutfiltrat gegenüber dem Blut auf das Zehnfache verdünnt ist, ist dieser Wert noch mit 10 zu multiplizieren.

Beispiel: Angewandt Standardlösung I, Höhe der Schicht der Standardlösung 30, der Schicht der Versuchslösung 24; es ergibt sich für den Traubenzuckergehalt des Blutfiltrates $c = 10 \cdot \frac{30}{24} = 12{,}5$ mg in 100 ccm, für den Zuckergehalt des Blutes $12{,}5 \cdot 10$ mg $= 125$ mg in 100 ccm bzw. 0,125 %.

Bestimmung der Azetonkörper (z. T. nach Engfeldt).

Prinzip: Aus enteiweißten Blut wird getrennt einerseits präformiertes Azeton und Azeton aus Azetessigsäure und andererseits Azeton aus Oxybuttersäure destilliert und das Azeton jodometrisch bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1. Natriumwolframat, 10 %; 2. Schwefelsäure $^2/_3$ n; 3. Schwefelsäure, verdünnt (20 ccm konz. H_2SO_4 werden auf 100 ccm verdünnt); 4. Chromatschwefelsäure (2 g Kaliumbichromat + 20 ccm konzentrierte Schwefelsäure werden mit Wasser auf 100 ccm verdünnt); 5. Natronlauge, konzentriert; 6. n/100 Jodlösung; 7. n/100 Thiosulfatlösung; 8. Stärkelösung, 1 %ig.

3—5 ccm unter Zusatz von Kaliumoxalat ungerinnbar gemachtes Blut (s. S. 63) werden in der S. 89 beschriebenen Art enteiweißt und filtriert. Zur Destillation des Filtrates benutzt man den für die Bestimmung des Azetons im Harn (S. 57) beschriebenen Apparat. 20 ccm des Filtrates, entsprechend 2 ccm Blut, werden in den Destillationskolben eingefüllt und 1 ccm der Schwefelsäure hinzugefügt. Das Auffangegefäß wird beschickt mit 2 ccm Jodlösung und 2 ccm konzentrierter Natronlauge. Nachdem die Verbindungen fest hergestellt sind,

wird unter direktem Erhitzen, wenn nötig, unter Ergänzung des verdampften Wassers durch den Trichter c, ein starker Luftstrom durchgesaugt, der während einer Dauer von 25 Minuten unterhalten wird und das gesamte Azeton (präformiertes und aus Azetessigsäure) aus der Lösung mitreißt. Nach Beendigung wird das Auffangegefäß abgenommen, gut verschlossen und 15 Minuten stehengelassen. In diesem Gefäß hat das freie Azeton sowie das aus Azetessigsäure entstandene Jodoform gebildet. Man schließt nun an den Apparat eine andere Vorlage an, welche genau in der gleichen Weise mit Jodlösung und Natronlauge beschickt ist. In das auf seinem Platze gebliebene Destillationsgefäß werden durch den Trichter in vier Portionen in gleichmäßigen Zwischenräumen 10 ccm Bichromatschwefelsäure zugesetzt und dabei unter Erhitzen weitere 25 Minuten lang destilliert. Das dabei übergehende und Jodoform bildende Azeton ist aus β-Oxybuttersäure gebildet. Man läßt auch dieses Aufnahmegefäß 15 Minuten lang stehen.

Zur Titration werden in jedes Auffangegefäß etwas über 2 ccm Schwefelsäure (3) gefügt, so daß die Lösung deutlich sauer und durch Jodausscheidung bräunlich gefärbt ist. Man fügt einige Tropfen Stärkelösung dazu und titriert mit n/100 Thiosulfatlösung bis zur Farblosigkeit in der wiederholt beschriebenen Weise.

Die Menge des Azetons berechnet sich daraus, daß 1 ccm $^1/_{100}$ Normal-Jodlösung 0,1024 mg Gesamtazeton entspricht. Da zur Bestimmung 2 ccm Blut angewendet worden waren (20 ccm Filtrat), so wird die Menge Azeton in 1 ccm durch Multiplikation der gefundenen Zahl mit 0,0512 in mg erhalten bzw. in Grammen auf 1000 ccm Blut. (Die Multiplikation mit der Zahl 0,1024 mg statt im allgemeinen 0,0967 mg erklärt sich daraus, daß man es mit einer Mischung von präformiertem Azeton und Azeton aus Azetessigsäure zu tun hat.) Das zweite Destillat enthält nach den Versuchen von Engfeldt eine Ausbeute von 69,2 % Aceton aus Oxybuttersäure, so daß 1 ccm $^1/_{100}$ Normal-Jodlösung 0,25 mg Oxybuttersäure entspricht.

Beispiel: Es seien vorgelegt für die Bestimmung des Gesamtazetons (präformiert und aus Azetessigsäure) 2,0 ccm Jodlösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 1,2 ccm Thiosulfatlösung, verbrauchte Jodlösung demnach 0,8 ccm. Das in der angewandten Blutmenge 2 ccm) enthaltene Azeton würde sich also zu 0,8 · 0,1024, also zu 0,0819 mg Azeton berechnen, die Menge des Gesamtazetons (präformiertes und aus Azetessigsäure) in 1 ccm zu 0,8 · 0,0512 mg = zu 0,041 mg, die Menge in 100 ccm also zu 4,1 mg. Zur Bestimmung des Azetons aus β-Oxybuttersäure seien ebenfalls 2 ccm Jodlösung vorgelegt, zum Zurücktitrieren seien 0,8 ccm Thiosulfat verbraucht. Die Differenz 1,2 · 0,25 mg = 0,3 mg entspricht der Menge Oxybuttersäure in 2 ccm Blut, in 1 ccm sind also 0,15 mg, in 100 ccm Blut 15 mg β-Oxybuttersäure enthalten.

Zur Bestimmung der Gesamtazetonkörper des Blutes (präformiertes Azeton, Azetessigsäure, Oxybuttersäure) erfolgt die Vorbereitung in der gleichen Weise wie oben beschrieben. Die Destillation erfolgt sofort nach Zusatz der Bichromatschwefelsäure. Für die Berechnung ist, wenn man alle Azetonkörper als Azetessigsäure ausdrücken will, die Menge des nicht verbrauchten Jods nach Engfeldt mit 0,22 mg zu multiplizieren.

Beispiel: Vorgelegt wurden 2 ccm Jodlösung, verbraucht zur Titration 0,4 ccm Thiosulfatlösung, verbrauchte Jodlösung 1,6 ccm. In 2 g Blut sind enthalten 1,6 · 0,22 = 0,352 mg Gesamtazeton, in 1 ccm Blut also 0,176 mg, in 100 ccm Blut 17,6 mg Azetonkörper, berechnet als Azetessigsäure.

Es ist noch möglich, bei der anfangs beschriebenen Methode das Azeton, welches präformiert ist, von dem Azeton aus der Azetessigsäure dadurch zu trennen, daß man zunächst ohne Erwärmen destilliert (präformiertes Azeton) und dann das Azeton aus Azetessigsäure nach Wechseln der Vorlage und Erwärmen der angesäuerten Lösung überdestilliert. (Vgl. auch bei Harn S. 58), vgl. dort auch über Hinterschaltung einer zweiten Vorlage und Anstellung eines Leerversuches.

Bestimmung der Fette und Lipoide nach Bang.

Prinzip: Nach den Untersuchungen von Bang werden mit Petroläther aus Blut, welches in Löschpapierblättchen — diese müssen besonders gut präpariert sein — aufgesaugt ist, nur Neutralfett und Cholesterin extrahiert, durch Alkohol Cholesterinester, Phosphatide und Seifen. Die Bestimmung der extrahierten Fette erfolgt durch ihre Reduktionswirkung auf Chromsäure, die in bestimmter Menge zugesetzt wird; durch Titration mit Thiosulfat wird die nicht zur Reduktion verbrauchte Chromsäure ermittelt und daraus die Menge Fett berechnet.

Notwendige Reagentien: 1. 1%ige Natronlauge, 2. Normalnatronlauge, 3. Normalschwefelsäure, 4. n/10 Chromsäurelösung mit Schwefelsäure, hergestellt durch Auflösen von 4,9083 g Kaliumbichromat in Wasser, Zugabe von 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure und Auffüllen auf 1000 ccm, 5. n/10 Thiosulfatlösung, 6. ½%ige alkoholische Digitoninlösung (warm herzustellen: wenn in der Kälte das Digitonin ausfällt, genügt leichtes Erwärmen zur Wiederlösung), 7. Petroläther, Siedepunkt 50—65 Grad, 8. 93%iger Alkohol, 9. 5%ige Jodkalilösung, 10. 1%ige Stärkelösung, 11. konz. Schwefelsäure.

Bang unterscheidet, wie schon erwähnt, 2 Extraktionen, einmal mit Petroläther, das andere Mal mit Alkohol.

I. Bestimmung des Neutralfettes und des Cholesterins.

a) Gemeinsame Bestimmung.

In S. 64—66 beschriebener Weise wird das Blut in Blättchen eingesaugt, die aber in diesem Falle vorher wiederholt mit Äther und Alkohol zu extrahieren sind, um eventuell in ihnen vorhandenes Fett zu entfernen. Nach Trocknen der Blättchen bringt man sie in trockene vorher durch Kaliumbichromat und Schwefelsäure gereinigte Reagenzgläser und setzt 8—10 ccm Petroläther zu, so daß die Blättchen gut bedeckt sind. Man extrahiert 60 Minuten, kann aber, wenn man will, die Blättchen auch in der Lösung über Nacht stehenlassen. Man nimmt nun mit einem kleinen Häkchen aus Glas oder aus Platin-

draht das Blättchen aus der Lösung heraus und kann es dann noch zur Bestimmung des zweiten Teiles der Fettkörper verwenden. Zur Bestimmung des gesamten Neutralfettes einschließlich des Cholesterins überführt man die Petrolätherlösung in ein kleines Erlenmeyerkölbchen und dampft die Hauptmenge des Petroläthers auf einem vorher stark erhitztem Sandbade nach Fortnahme der Flamme oder auf einem elektrisch geheizten Apparat ab; will man den Petroläther wiedergewinnen, so setzt man auf die Kölbchen Stopfen mit einem doppelt gebogenen Rohr, das unten in ein Auffangegefäß mündet. Nachdem der Petroläther fast vollständig abgedampft ist, fügt man zu der zunächst abgekühlten Lösung 1 ccm 1%ige Natronlauge (1) und erhitzt nun auf dem Sandbade so lange, bis jeder Geruch des Lösungsmittels verschwunden ist. Durch diese Behandlung wird das Fett zugleich emulgiert und der Oxydation durch die Chromsäure leichter zugänglich gemacht. Man gibt dann genau 1 ccm Chromsäurelösung (4) dazu und läßt bis zur Erkaltung der Mischung stehen. Darauf gibt man aus einer Bürette mit Glashahn 5 ccm konzentrierte reine Schwefelsäure zu, schüttelt um und läßt mindestens 15 Minuten stehen. In dieser Zeit tritt eine Reduktion eines Teiles der Chromsäure durch das Fett ein, was sich durch eine Veränderung der gelben Chromsäurefärbung kundgibt. Bei der Reduktion wird Chromsäure in grünes Chromoxyd umgewandelt. Ist nicht sämtliche Chromsäure reduziert worden, so wird eine Mischfarbe zwischen gelb und grün, eine gelbgrüne Färbung resultieren. Sollte eine rein grüne Färbung entstehen, so ist sämtliche Chromsäure verbraucht worden; es kann jetzt noch nachträglich neue zugefügt werden: man gibt in diesem Falle zuerst 1 ccm (stets mit der Pipette zu entnehmen) weitere Chromsäurelösung zu und beobachtet, ob wieder ein gelblicher Ton auftritt. Bleibt auch dann die Färbung rein grün, so muß nochmals Chromsäure hinzugefügt werden: dann ist es aber erforderlich, für je 1 ccm Chromsäure auch 2 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzuzugeben. Ist die Reduktion der Chromsäure nun vollendet, und, an der

Färbung gemessen, noch ein Überschuß davon vorhanden, so überspült man die ganze Lösung in ein Erlenmeyerkölbchen von ungefähr 200 ccm Fassungsraum und spült mit soviel Wasser wiederholt nach, so daß das Gesamtvolumen 125 ccm beträgt. Man fügt zur Lösung sodann zwanzig Tropfen 5prozentiger Jodkalilösung und einige Tropfen 1prozentiger Stärkelösung und titriert mit einer Mikrobürette mit n/10 Thiosulfatlösung. Der Umschlag erfolgt in diesem Falle nicht wie bei Bestimmung der Stickstoffsubstanzen und des Blutzuckers von blau nach farblos, sondern von blau nach leichtgrünlich, welche Färbung durch das Chromoxyd bedingt ist.

Die Anwendung von n/10 Normallösungen ergibt sich aus der erheblichen Reduktionsfähigkeit der Fette. 1 mg Triolein — als Prototyp der Fette gerechnet, sowohl diese wie auch Cholesterin und Cholesterinester reduzieren fast gleichmäßig — reduziert 2,45 ccm n/10 Chromsäurelösung. Die Fettmenge ergibt sich demnach aus der zugesetzten Chromsäuremenge abzüglich der verbrauchten Menge Thiosulfatlösung; die erhaltene Zahl wird durch 2,45 dividiert und so die Fettmenge in der angewandten Analysensubstanz in Milligramm erhalten. Ein genau in gleicher Weise ausgeführter Leerversuch muß vorangehen. Die in diesem verbrauchte Chromsäuremenge muß natürlich in Anrechnung gebracht werden.

b) Bestimmung des Neutralfettes.

Die Bestimmung des Neutralfettes ist eine Differenzbestimmung. Sie beruht darauf, daß nach Windaus das Cholesterin durch eine Digitoninlösung als Digitonid ausgefällt wird. Eine Probe Blut wird in ganz gleicher Weise entnommen und ebenfalls mit Petroläther extrahiert. Man destilliert den Petroläther zum größten Teil, bis auf ungefähr 1 ccm ab, setzt dann 0,1 ccm Digitoninlösung (6) dazu und erwärmt einige Augenblicke weiter auf dem Sandbad. Zur besseren Ausscheidung und Absetzung des Digitonids läßt man bis zum nächsten Tage stehen und filtriert dann den Petroläther mit Hilfe eines ganz kleinen Trichters und eines ebensolchen,

durch vorherige Extraktion mit Äther fettfrei gemachten Filters in ein kleines Wägegläschen oder dgl. ab und wäscht das erste Gläschen mit 1—2 ccm Petroläther nach, welche man gleichfalls durch das Filterchen gießt. Auch hier kann man mit Vorteil die „Filtergeräte“ von Schott & Gen. benutzen, die vorher mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure zur Entfernung etwaiger Fettspuren zu reinigen, mit destilliertem Wasser zu spülen und zu trocknen sind. Man verfährt nun genau so, wie bei der Bestimmung des petrolätherlöslichen Gesamtfettes beschrieben, d. h. man destilliert auf dem Sandbad zunächst den Petroläther ab, setzt 1 ccm 1 $^0/_0$ige Natronlauge (1) hinzu und erwärmt so lange, bis der Geruch vollständig verschwunden ist. Man setzt — genau mit der Pipette gemessen — 1 ccm Chromsäurelösung zu, nach einigem Stehen 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure und nimmt, wenn eine gelbgrüne Färbung nach Ablauf von 15 Minuten erschienen ist, die Überspülung und Titration vor. Man erhält auf diese Weise (selbstverständlich nachdem man eine eventuelle Chromsäurereduktion durch die Reagentien, besonders das Löschpapier allein berücksichtigt hat) den Gehalt des Blutes an Neutralfett.

c) Die Menge des Cholesterins ergibt sich als Differenz der Werte unter a und b.

Die Berechnung erfolgt auf Grund der oben angegebenen Verhältnisse.

Beispiel: Es seien abgewogen worden für die Bestimmung von Neutralfett + Cholesterin 90 mg Blut. Behufs Reduktion ist zugefügt worden zur Fettemulsion 2 ccm n/10 Chromsäurelösung: zur Zurücktitration seien gebraucht 0,85 ccm n/10 Thiosulfatlösung, so daß die reduzierte Menge der Chromsäurelösung 1,15 ccm beträgt. Ein Leerversuch mit unbeschickten Blättchen habe ergeben bei Vorlage von 2 ccm $^1/_{10}$ Chromsäurelösung einen Verbrauch von 1,95 ccm Thiosulfatlösung. Die hiernach für den Leerversuch verbrauchten 0,05 ccm Chromsäurelösung sind von den oben gefundenen 1,15 ccm abzuziehen, so daß für die Oxydation des Blutfettes 1,10 ccm Chromsäurelösung verbraucht wären. Durch Division dieser Zahl durch die oben abgeleitete Kon-

stante 2,45 erhält man die Anzahl mg Neutralfett + Cholesterin in der angewandten Blutmenge. Die Berechnung ergibt 0,449 mg in 90 mg Blut, d. h. 0,499 mg in 100 mg Blut oder 0,499 g in 100 g Blut.

Das Gewicht eines Blättchens, das zur Bestimmung des Neutralfettes (b) allein verwendet worden ist, betrage 70 mg, sein Gewicht mit Blut 165 mg, das Gewicht des angewandten Blutes also 95 mg. Es seien vorgelegt 1 ccm Chromsäurelösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 0,10 ccm Thiosulfat, so daß 0,90 ccm Chromsäure reduziert worden waren. Hiervon sind nach dem oben geschilderten Leerversuch 0,05 ccm abzuziehen, so daß für die reine Reduktion des Neutralfettes 0,85 ccm übrigbleiben. 0,85 : 2,45 = 0,347 mg Neutralfett in 95 mg angewandten Blut. In 100 mg wären danach enthalten 34,7 : 95 = 0,365 mg Neutralfett. Nach obiger Rechnung betrug die Menge von Gesamtfett + Cholesterin in 100 g 0,499 g, nach der letzten Berechnung die des Neutralfettes in 100 g 0,365 g; es ergibt sich hieraus die Menge des Cholesterins zu 0,134 g in 100 g Blut.

II. Bestimmung der Cholesterinester und der Phosphatide.

Hierfür wird mit 93%igem Alkohol extrahiert. Man verwendet für diesen Zweck die bereits mit Petroläther extrahierten Blättchen, die man aus der Petrolätherlösung mit Hilfe eines am Ende hakenförmig gebogenen Drahtes oder Glasstabes herausnimmt, in trockene Reagensgläser überführt und mit 93% Alkohol vollständig übergießt.

a) Cholesterinester.

Die Extraktion dauert mindestens 24 Stunden. Man gießt dann zur Bestimmung der Cholesterinester den Alkohol ab, fügt 1 Tropfen 25%iger Natronlauge dazu, dampft auf dem elektrischen Bade oder auf einem Wasserbad in einem passenden Gläschen — auch hier ist ein Wägegläschen oder ein ganz kleiner weithalsiger Erlenmeyerkolben geeignet — ab, wodurch die Cholesterinester verseift werden. Es folgt zur Bestimmung des Cholesterins eine Extraktion mit Petroläther: man gibt 8—10 ccm Petroläther hinzu, verschließt das Gefäß gut und läßt 24 Stun-

den stehen. Nach dieser Zeit gießt man den Petroläther durch ein kleines fettfreies Filter in ein kleines Wägegläschen ab, wäscht noch mit ungefähr 4—5 ccm Petroläther aus und gießt diesen ebenfalls durch das Filter. Die weitere Bestimmung entspricht der oben beschriebenen: unter Zusatz von 1 ccm 1 %iger Natronlauge wird auf dem Sandbade bis zum völligen Verschwinden des Petroläthergeruches abgedampft, Chromsäuregemisch und Schwefelsäure zugegeben und, wie oben beschrieben, mit $^1/_{10}$ n-Thiosulfatlösung titriert.

b) Phosphatide, Cholesterinester und Seifen.

Zur Bestimmung der Phosphatide wird der in gleicher Weise wie bei der Bestimmung der Cholesterinester hergestellte alkoholische Extrakt nach Zusatz von 1 Tropfen n-Natronlauge auf dem Sandbade ebenfalls bis zur Entfernung des Alkohols verdampft und völlig getrocknet. Es wird 1 Tropfen Normalschwefelsäure und 10 ccm Petroläther zugegeben, der Rückstand mit dem Lösungsmittel mit Hilfe eines dünnen Glasstäbchens gut verrührt und 1 bis 2 Stunden stehengelassen. Hiernach filtriert man den Petroläther durch ein kleines trockenes, entfettetes Filterchen in ein kleines Wägegläschen, wäscht den Rückstand nochmals mit der halben Menge Petroläther aus und gibt diesen durch das Filter zur anderen Flüssigkeit. Man dampft den Petroläther, wie oben beschrieben, auf dem Wasserbad ab unter Zusatz von 1 ccm 1 %iger Natronlauge, gibt nach völligem Verdunsten des Lösungsmittels Chromsäuregemisch und Schwefelsäure hinzu und verfährt, wie oben angegeben. Man bekommt auf diese Weise die Cholesterinester, die Phosphatide und die Seifen, als Fettsäuren berechnet. Eine Trennung der letzteren beiden Komponenten gelingt nach der Bangschen Methode nicht. Durch Subtraktion des für die Cholesterinester erhaltenen Wertes bekommt man den Gehalt an Phosphatiden und Seifen.

Die Berechnung dieser beiden Fraktionen gestaltet sich, wenn sie genau durchgeführt werden soll, außerordentlich schwierig, da Cholesterin und Cholesterinester zwar genau die gleiche Menge Chromsänrelösnng reduzieren

wie Fette, d. h. 1 mg reduziert 2,45 ccm n/10 Chromsäurelösung, und auch die Zahl für Fettsäuren diesem Werte praktisch gleichkommt (1 mg Fettsäure reduziert 2,50 ccm n/10 Chromsäure), die Phosphatide aber ein erheblich geringeres Reduktionsvermögen aufweisen: 1 mg Phosphatid reduziert nur 1,7 ccm n/10 Chromsäure. Bang hilft sich damit, daß er auch die Phosphatide und Seifen als Fettsäuren berechnet und demgemäß die gleiche Reduktionszahl benutzt. Da die Trennung der beiden Fraktionen immerhin ziemlich schwierig ist, und für die Lipoide in Gestalt des fettlöslichen P genauere Methoden zur Verfügung stehen, wird man sich in vielen Fällen damit begnügen, Cholesterinester, Phosphatide und Seifen zusammen zu bestimmen. In diesem Fall gestaltet sich die Berechnung genau wie für das Neutralfett und das Cholesterin beschrieben. Anderenfalls müssen beide Bestimmungen durchgerechnet werden. Hierfür ein

Beispiel: Bestimmung der Gesamtfraktion II (Verfahren b): Abgewogen seien (da bereits zur Bestimmstimmung der Neutralfettfraktion benutzt, natürlich vor der primären Petrolätherextraktion) 90 mg Blut. Es war zur Reduktion zugefügt worden 1 ccm n/10 Chromsäure, zum Zurücktitrieren seien gebraucht worden 0,56 ccm Thiosulfatlösung, so daß 0,44 ccm Chromsäurelösung durch Cholesterin aus Estern, Phosphatiden und Seifen reduziert worden waren. Abzuziehen hiervon wären die im Vorversuch (S. 116) verbrauchten 0,05 ccm Chromsäurelösung, so daß in Wahrheit 0,39 ccm Chromsäurelösung reduziert worden sind. Wird nach dem oben genannten Einheitsmaß berechnet, so bekommt man durch Division mit 2,45 die Menge der hier bestimmten Fettsubstanzen (Cholesterin, Phosphatide und Seifen als Fettsäure berechnet) in Milligramm. Die Division ergibt 0,159 mg in den angewandten 90 mg Blut, also 0,177 mg in 100 mg, 0,177 g in 100 g Blut. Andererseits sei zur Bestimmung der Cholesterinester (IIa) 95 mg Blut abgewogen worden; zur Reduktion zugegeben 1,0 ccm Chromsäurelösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 0,74 ccm Thiosulfat, Differenz 0,26 ccm Chromsäure, hiervon abgezogen

0,05 ccm (Leerbestimmung), Rest 0,21 ccm Chromsäure. Durch Division mit 2,45 erhält man 0,086 mg Cholesterin aus Estern in 95 mg Blut bzw. 0,086 g Cholesterin (gebundenes) in 95 g Blut oder 0,091 g Cholesterin (gebundenes) in 100 g Blut. Die Differenz des oben gefundenen Gesamtwertes der Fraktion 0,177 g und des Cholesterinwertes 0,091 g ergibt 0,086 g Phosphatide + Seifen, als Fettsäure berechnet. Will man diesen Wert als „Phosphatide" ausdrücken — diese machen den größten Teil der Menge aus —, so muß man infolge der geringeren Reduktion der Phosphatide (s. die obige Angabe) den gefundenen Wert mit $^3/_2$ multiplizieren, und man würde in diesem Falle den Wert dieser Halbfraktion so ausdrücken, daß in 100 ccm Blut 0,129 mg „Phosphatide" enthalten wären.

Es soll nicht verschwiegen werden, daß diese Differenzierung nicht ganz einwandfrei ist; sie gibt nur ein allgemeines Bild über die Verteilung der „Fettsubstanzen", ohne daß man die Zahlen mit absoluter Sicherheit für die einzelnen Fraktionen reklamieren kann. Für praktische Zwecke empfiehlt es sich im allgemeinen, die Bestimmung und Differenzierung der ersten Hauptfraktion, Neutralfett und Cholesterin, vorzunehmen und sich mit einer zusammengefaßten Bestimmung der zweiten, alkohollöslichen Hauptfraktion (b) zu begnügen. Die Resultate sind bei dieser Beschränkung zuverlässig, die Bestimmungen bei einiger Übung ohne erhebliche Schwierigkeiten durchzuführen.

Bestimmung des Gesamtfettes.

Prinzip: Das mit Salzsäure behandelte Blut wird mit Äther extrahiert und im gewaschenen, abgedampften Ätherextrakt jodometrisch das Fett bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1.—4. die bei der Bestimmung der Fette nach Bang genannten. 5. Äther. 6. Salzsäure, konzentriert: 1,19. 7. konzentrierte Schwefelsäure. 8. Jodkalilösung: 5%ig. 9. Thiosulfatlösung: $^1/_{50}$ normal. 10. Stärkelösung: 1%ig.

Mit einer genauen, 0,1 ccm fassenden Pipette wird dieses Quantum Blut aus der Fingerbeere entnommen

und quantitativ in ein fettfreies (S. 113) Reagenzglas überführt. Man gibt 3 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu und stellt 1/2 Stunde in ein siedendes Wasserbad. Man läßt abkühlen, verdünnt die Lösung mit 5 ccm Wasser und überführt sie quantitativ in einen ungefähr 30 ccm fassenden Scheidetrichter von langer schmaler Form, spült das Reagenzglas noch 2mal mit zusammen 5 ccm Wasser aus und gibt diese auch in den Scheidetrichter hinein. Man bringt in das Reagenzglas 10—12 ccm Äther und gießt diese nun auch in den Scheidetrichter. Jetzt wird 2—3 Minuten gut ausgeschüttelt. Sollte beim Stehenlassen sich die ätherische Schicht schlecht von der wäßrigen trennen, indem sich an der Grenze ein ziemlich beständiger Schaum bildet, so läßt man zunächst die Hauptmenge der klaren wäßrigen Schicht ab und bläst dann mit einer kleinen Pipette Luft durch die Flüssigkeit durch, indem man die Pipette mit ihrer Spitze dicht unter die Trennungsschicht führt. Ist die Grenze nun scharf geworden, so läßt man die wäßrige Lösung möglichst vollkommen ab und gibt nun zu der im Scheidetrichter zurückgebliebenen Lösung ungefähr 10 ccm Wasser. Man schüttelt mit diesem (zur Entfernung eventueller Spuren von Salzsäure) durch, läßt die wäßrige Schicht wieder ab und gießt nun durch die obere Öffnung des Scheidetrichters die ätherische Lösung in einen kleinen Erlenmeyerkolben von 25 ccm Inhalt. Die vorher abgelassene wäßrige Lösung einschließlich des Waschwassers wird nochmals mit 10 ccm Äther 1 Minute ausgeschüttelt, die wäßrige Schicht abgelassen, die zurückbleibende ätherische Lösung ebenfalls mit 5 ccm Wasser gewaschen, das Wasser wieder abgelassen und die Ätherlösung in den Erlenmeyerkolben zu der anderen getan. Man erwärmt jetzt auf einem elektrischen Sandbad, bis der Äther vollständig entfernt ist, läßt kurz abkühlen, gibt dann 1 ccm 1%ige Natronlauge dazu und mischt durch leichtes Schütteln gut um.

Man gibt jetzt 2 ccm Chromsäurelösung und 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu und läßt 1/2 Stunde lang stehen. Hiernach überführt man die Lösung quantitativ unter Verwendung von 150 ccm Wasser in einen großen

Erlenmeyerkolben, fügt 1 ccm (20 Tropfen) Jodkalilösung, nach Umschütteln ferner 3 Tropfen Stärkelösung hinzu und titriert bis zur Entfärbung bzw. Entstehung eines leicht grünlichen Tones mit n/50 Thiosulfatlösung.

Neben der Vollbestimmung muß, wenigstens einmal am Tage, eine Leerbestimmung ausgeführt werden, indem die zur Verwendung kommende Menge Äther auf dem elektrischen Bade abgedampft und dann wie eine richtige Probe behandelt wird. Es ergibt sich hier auch bei sehr reinen Substanzen stets eine gewisse Reduktion.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß (ebenso wie bei der Bestimmung nach Bang geschildert) 1 mg Fett 2,45 ccm n/10 Chromsäurelösung entspricht. Die Menge der zur Oxydation zugesetzten Chromsäurelösung abzüglich $^1/_5$ der angewandten Thiosulfatlösung (da diese ja nicht $^1/_{10}$, sondern $^1/_{50}$ normal ist) entspricht der Oxydation des Fettes. Dieser Wert ist aus dem oben angegebenen Grunde durch 2,45 zu dividieren, woraus sich die mg Fett in der angewandten Menge (0,1 ccm) Blut ergeben. Von dieser Zahl ist die auf gleiche Weise zu berechnende des Kontrollversuches abzuziehen.

Beispiel: Es seien angewandt 0,1 ccm Blut; es seien zugegeben worden 2 ccm Chromsäurelösung, zum Zurücktitrieren seien verbraucht worden 4,80 ccm n/50 Thiosulfat entsprechend 0,96 ccm n/10 Thiosulfat. Die Reduktion des Fettes entsprach also dem Verbrauch von 2,0 — 0,96 = 1,04 ccm n/10 Chromsäurelösung. Diese Zahl dividiert durch 2,45 ergibt 0,425 mg Fett. Der zugleich angestellte Kontrollversuch, bei welchem nur 1 ccm Chromsäurelösung zugegeben worden war, habe verbraucht 2,6 ccm n/50 Thiosulfalt = 0,52 ccm n/10 Thiosulfat. Die verbrauchte Chromsäure betrug also 1,0 — 0,52 = 0,48; entsprechend also 0,48 dividiert durch 2,45 = 0,195 mg Fett. Die Differenz 0,425 — 0,195 = 0,230 mg ist also die Fettmenge in 0,1 ccm Blut: 100 ccm enthalten also 0,230 g = 0,230 $^0/_0$.

Nephelometrische Fettbestimmung nach Bloor.

Prinzip: Die in einer wäßrigen Lösung des verseiften, extrahierten Fettes durch Zusatz von Säure erzeugte

Trübung wird mit der einer Standardlösung aus Triolein im Nephelometer verglichen.

Gebrauchte Reagenzien: 1. Alkohol-Äthermischung, bestehend aus drei Teilen redestilliertem, absolutem Alkohol und einem Teil reinstem Äther; 2. Alkoholische Natronlauge, normal; 3. verdünnte Salzsäure (1 Teil konzentrierte Salzsäure und 4 Teile Wasser); 4. Standardoleinlösung: 200 mg Triolein werden in der Alkoholätherlösung (1) in einem Meßkolben von 500 aufgelöst und zur Marke aufgefüllt. Die Lösung enthält in 5 ccm 2 mg Triolein.

In einen Meßkolben von 50 ccm, welcher ungefähr 40 ccm der Lösung 1 enthält und der vorher mit der Lösung, nachdem der Stopfen aufgesetzt war, zu wiegen ist, werden aus einer Spritze ungefähr 2 ccm Blut langsam hereingespritzt, während der Kolben dauernd umgeschüttelt wird. Der Stopfen wird wieder aufgesetzt und wieder gewogen und so das Gewicht des zugegebenen Blutes festgestellt. Man kann auch das Blut in die alkoholische Ätherlösung — ohne Wägung — mit einer Pipette oder auch einer sehr genau graduierten Spritze hereinbringen und bestimmt in diesem Falle den Fettgehalt in dem gemessenen Volumen. Aus diesem kann man annährend das Gewicht durch Multiplikation mit 1,06 (mittleres spezifisches Gewicht des Blutes) berechnen. Man bringt nun den Kolben in ein kochendes Wasserbad und läßt ihn dort, bis der Inhalt gerade zu sieden anfängt, kühlt dann sofort unter der Wasserleitung ab, füllt mit dem Alkohol-Äthergemisch bis zur Marke auf und mischt gut durch. Bei der Entnahme des Blutes ist darauf zu achten, daß man das Kölbchen nicht mit der warmen Hand anfaßt, um Abdunsten von Äther zu vermeiden. Man filtriert nun schnell die Lösung durch ein Faltenfilter in ein trocknes Gefäß, wobei ebenfalls darauf zu achten ist, daß kein Verlust an Lösungsmittel durch Wärme entsteht. An warmen Tagen muß daher das zur Aufnahme der Lösung benutzte Gefäß in kaltes Wasser gestellt werden. Es ist darauf zu halten, daß alle diese Manipulationen, natürlich mit Ausnahme des Kochens, bei einer gleichbleibenden Temperatur erfolgen und möglichst schnell ausgeführt werden.

Von dem Filtrat bringt man in 2 kleine Bechergläschen oder weithalsige Erlenmeyerkölbchen von ungefähr 40 ccm Fassungsraum einen aliquoten Teil des Filtrates herein. Im allgemeinen wird sich bei Anwendung von ungefähr 2 ccm Blut 15 ccm als die richtige Menge erweisen. Man fügt zu jeder Probe 2 ccm der alkoholischen Natronlauge (2) und läßt auf einem elektrischen Bade oder einem Sandbade die Mischung abdampfen, bis alles Lösungsmittel verdampft und die Verseifung vollzogen ist.

Inzwischen hat man 3 Kölbchen von ungefähr 200 ccm Fassungsraum mit je 100 ccm reinem destilliertem Wasser beschickt. Man löst nun den Rückstand in den kleinen Kölbchen in je 5 ccm der Alkohol-Ätherlösung auf unter leichtem Erwärmen, so daß nur noch einige Flocken des Natriumhydrats ungelöst bleiben, und bringt nun den Inhalt unter Umrühren in je eins der mit Wasser beschickten Kölbchen: die kleinen Gläschen werden durch Zurückgießen von etwas Lösung aus den großen Kölbchen noch einmal ausgespült und der Inhalt wieder in den betreffenden Kolben zurückgegossen. (Die Doppelanalyse empfiehlt sich, um das Resultat ganz sicher zu gestalten.) In das dritte Kölbchen mit Wasser gibt man 5 ccm der Standardlösung (4) herein und mischt auch dieses Kölbchen durch leichtes Umschwenken. Nach ungefähr 5 Minuten gibt man in jedes Kölbchen 10 ccm der Salzsäure (3), mischt durch leichtes Schütteln und schließt nach 5 Minuten langem Stehen den nephelometrischen Vergleich in der an anderer Stelle (S. 19) beschriebenen Weise an, der in weiteren 5 Minuten beendet sein muß.

Die Berechnung gründet sich darauf, daß in der angewandten Kontrollösung 2 ccm Triolein enthalten sind. Die Menge des in der angewandten Probe enthaltenen Fettes entspricht also: 2 mg multipliziert mit $\frac{s_1}{s}$, worin s_1 der Schichtdicke der Vergleichslösung, s der der Versuchslösung entspricht.

Beispiel: Es seien durch Wägung 1,8 g Blut festgestellt worden. Von diesen, die zunächst auf 50 ccm aufgefüllt waren, sind 15 zur Analyse verwandt worden.

Die nephelometrische Bestimmung habe ergeben für s_1 30, für s 40 mm. Es berechnet sich also die Menge des in den 15 ccm der Extraktlösung befindlichen Fettes zu 2 mg multipliziert mit $\frac{30}{40} = 1{,}5$ mg, die Menge des in den gesamten 50 ccm Extrakt vorhandenen Fettes zu 1,5 mal $\frac{50}{15} = 5{,}0$ mg Fett. Da die Blutmenge 1,8 g betrug, so ergibt sich die Menge des Fettes in 100 g nach der Gleichung $1{,}8 : 5 = 100 : x$ zu 278 mg oder 0,278 %.

Bestimmung des Cholesterins (Prinzip Autenrieth).

Die Bestimmung beruht auf der Farbreaktion des Cholesterins mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure und dem kolorimetrischen Vergleich mit einer bekannten Lösung.

Erforderliche Reagentien: 1. Kalilauge 25 %; 2. Chloroform; 3. Natriumsulfat, wasserfrei; 4. Essigsäureanhydrid; 5. Schwefelsäure konzentriert; 6. Cholesterin, Vergleichslösung (s. u.)

1 ccm Serum (mit einer genauen Pipette entnommen) werden in ein Erlenmeyerkölbchen von 30 ccm Inhalt eingebracht, 10 ccm 25 %ige Kalilauge zugefügt und nach Umschütteln das Kölbchen in ein kochendes Wasserbad eingestellt. Nach 2—3 Stunden langem Kochen läßt man abkühlen und gießt dann die Mischung in einen kleinen, ungefähr 30 ccm haltenden Scheidetrichter hinein. Man spült das Gefäß mit 10 ccm Chloroform aus und gibt dieses ebenfalls in den Scheidetrichter hinein. Man schüttelt kräftig aus, läßt sich die beiden Schichten trennen und läßt dann die untere Chloroformschicht in ein trockenes Kölbchen ab. Zu der im Scheidetrichter zurückgebliebenen Reaktionsflüssigkeit gibt man ungefähr 8 ccm Chloroform, schüttelt wieder gut durch und gibt das abgesetzte Chloroform zu dem abgelassenen. Man wiederholt die Prozedur mit ca. 8 ccm Chloroform nochmals und vereinigt die Chloroformextrakte mit den anderen. Um die fast immer trübe Chloroformlösung vom trübenden Wassergehalt zu befreien, gibt man in

das Fläschchen 5 g wasserfreies Natriumsulfat und schüttelt energisch durch. Die so wasserfrei gemachte Chloroformlösung wird durch ein trockenes Filter in ein trockenes 25-ccm-Meßkölbchen filtriert, das Kölbchen mit etwas frischem Chloroform nachgewaschen und das Meßkölbchen mit Chloroform bis zur Marke aufgefüllt.

Je nachdem, welches Kolorimeter man verwenden will, wird an einem Teil dieser natürlich gut durchzumischenden Chloroformlösung die Farbenreaktion angestellt. Bei Benutzung des Autenriethschen Kolorimeters, wo die Versuchslösung in den Trog eingefüllt wird, genügen 5 ccm Chloroformlösung, bei Anwendung eines größeren Kolorimeters werden im allgemeinen 20—25 ccm erforderlich sein. Die Mengenverhältnisse für die weitere Verarbeitung sind entsprechend zu nehmen. Zu je 5 ccm Chloroformlösung werden 2 ccm Essigsäureanhydrid [$(CH_3CO)_2O$] und 3 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und das Gefäß im Dunkeln 15 Minuten bei 32—35 Grad stehengelassen. In dieser Zeit hat sich die Färbung optimal entwickelt. Zum Vergleich kann man entweder den für das Autenriethsche Kolorimeter hergestellten Farbkeil verwenden, oder — das ist für den Leerkeil des Autenriethschen Apparates wie für die anderen Kolorimeter erforderlich —, man muß sich eine Cholesterinlösung bekannten Gehaltes herstellen. In diesem Falle löst man 2 mg Cholesterin (sehr genau!) in 25 ccm Chloroform und gibt zu der Lösung 10 ccm Essigsäureanhydrid und 6 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure[1]). Die Lösung bleibt mit der anderen zusammen 15 Minuten bei 32—35 Grad im Dunkeln stehen. Der kolorimetrische Vergleich wird in üblicher Weise durchgeführt.

Die Berechnung erfolgt bei Verwendung des Autenriethschen Kolorimeters und des fertigen Farbkeiles durch Ablesen der Skala und Aufsuchen des entsprechenden

[1]) Zweckmäßig stellt man sich eine Stammlösung von 100 mg Cholesterin auf 250 ccm Chloroform her, von der man zu jedem Versuch 5 ccm mit Chloroform auf 25 ccm verdünnt.

Wertes in einer beigegebenen Tabelle.[1]) Bei Verwendung einer nach obiger Vorschrift angefertigten Vergleichslösung ergibt sich für diese ein Cholesteringehalt von 2 mg in 25 ccm. Bei Farbengleichheit bei gleicher Schichtdicke würde also die Versuchslösung in 25 ccm, bzw. der darin enthaltene 1 ccm Serum ebenfalls 2 mg Cholesterin enthalten, 100 ccm Serum also 200 mg. Sind die Schichtdicken bei gleicher Farbtiefe verschieden, so berechnet sich der Cholesterinwert nach der wiederholt angewandten Formel $c = \frac{c_1 \cdot s_1}{s}$.
Der Cholesteringehalt in 100 ccm Serum ist demnach 200 mg multipliziert mit dem Quotienten

$$\frac{\text{Schichtdicke der Testlösung}}{\text{Schichtdicke der Versuchslösung}}.$$

Für stärkere Cholesterinkonzentrationen verwendet man eine Lösung von 4 mg Cholesterin in 25 ccm Chloroform, die genau auf die gleiche Weise behandelt wird; man verdünnt also die Stammlösung auf das Zweieinhalbfache: also 10 ccm Stammlösung + 15 ccm Chloroform. Bei der Berechnung ist dann statt 200 mg 400 mg einzusetzen.

Beispiel: Angewandt 1 ccm Serum, Chloroformextrakt 25 ccm, behandelt wie oben angegeben, Vergleichslösung 2 mg Cholesterin in 25 ccm Chloroform. Die kolorimetrische Ablesung ergibt für die Vergleichslösung eine Schichtdicke von 20 mm, für die Versuchslösung eine solche von 25 mm bei Farbengleichheit. Der Cholesteringehalt der Lösung ergibt sich für 100 ccm Blut zu

$$\frac{20 \cdot 200}{25} = 160 \text{ mg Cholesterin.}$$

Der Cholesteringehalt des normalen Blutes beträgt ungefähr 160—180 mg %.

Bestimmung der Harnsäure nach Folin und Wu.

Prinzip: Harnsäure wird zusammen mit den Chloriden durch Silber gefällt, aus dem Niederschlag die Harnsäure durch HCl-haltige Kochsalzlösung herausgelöst und mit

[1]) Sind dort andere Verdünnungsverhältnisse angegeben, so sind die Werte entsprechend zu reduzieren!

Hilfe des Folinschen Harnsäurereagens die freigesetzte Harnsäure kolorimetrisch bestimmt.

Nötige Reagentien: 1. Zur Enteiweißung (Wolframsäure) die bei Reststickstoff S. 89 angegebenen; 2. 5 %ige Lösung von Silberlaktat in 5 %iger Milchsäure; 3. 10 %ige NaCl-Lösung in n/10 HCl; 4. 5 %ige Natriumcyanidlösung; 5. Natriumkarbonatlösung 20 %ig; 6. Natriumsulfitlösung 10 %ig; 7. Harnsäurereagens nach Folin: 100 g Natriumwolframat werden mit 80 ccm 85 %iger Phosphorsäure (spez. Gew. 1,70) und 750 ccm Wasser 3 Stunden (unter dem Abzuge!) unter zeitweisem Ersatz des verdampften Wassers gekocht, nach dem Abkühlen wird auf 1 l aufgefüllt; 8. Harnsäurestandardlösung. Durch Lösen von 200 g Natriumsulfit und Auffüllen mit Wasser auf 1 l wird eine 20 %ige Na_2SO_3-Lösung hergestellt, die man zum besseren Absetzen über Nacht stehen läßt und dann zum Entfernen etwaiger Trübungen noch filtriert. Andererseits löst man 100 mg reinste Harnsäure (genau auf der chemischen Wage wiegen) in 15 ccm einer 0,4 %igen Lithiumkarbonatlösung und bringt diese Lösung quantitativ unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in einen 1000 ccm Meßkolben. Man gibt hierzu noch ca. 300 ccm Wasser, ferner 500 ccm der 20 %igen Natriumsulfitlösung (die nicht gebrauchte 20 %ige Na_2SO_3-Lösung verdünnt man mit der gleichen Menge destillierten Wassers und gewinnt so die Lösung Nr. 6) und füllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf. Nach gutem Durchmischen füllt man die Lösung in saubere trockne Flaschen von 200 ccm ab, verkorkt sie gut, am besten mit Gummistopfen, und überzieht Kork und Flaschenhals mit Paraffin, indem man diese Teile einfach in geschmolzenes Paraffin eintaucht. Die so verschlossene Lösung hält sich einige Monate; wenn sie zum Gebrauch öfter geöffnet wird — bei dieser Flasche braucht man die Paraffindichtung nicht immer zu wiederholen —, bleibt sie ungefähr 4 Wochen lang unverändert[1]).

Man enteiweißt mindestens 5 ccm Blut in der S. 89 angegebenen Weise. Man pipettiert 20 ccm des Blut-

[1]) Neuerdings empfiehlt Folin zur besseren Haltbarmachung der Standardlösung den Zusatz von 25 ccm Formalin ad 1000 ccm Lösung.

filtrates in ein großes Zentrifugenglas hinein (sind so große Gläser nicht vorhanden, so gibt man in 2 Zentrifugengläser je 10 ccm), fügt 4 ccm Silberlaktatlösung (2) dazu, rührt gut um und zentrifugiert 5—10 Minuten in einer gut laufenden Zentrifuge. Durch Zusatz eines Tropfens Ag-Lösung zu der klaren überstehenden Flüssigkeit prüft man, ob noch eine Fällung entsteht — bejahenden Falles werden noch 2 ccm Silberlösung zugegeben, umgerührt und nochmals zentrifugiert. Entsteht keine Fällung mehr, was die Regel ist, so gießt man die überstehende Flüssigkeit ab, was ohne Schwierigkeit gelingt, da der Niederschlag fest am Boden haftet. Man fügt nun zu diesem 2 ccm der Kochsalzlösung (3), ungefähr 10 ccm Wasser, rührt wieder gut um und zentrifugiert. Die Harnsäure geht hierbei in die überstehende klare Flüssigkeit. Man bringt diese nun, vom Bodensatz abgießend, quantitativ unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in einen Meßkolben von 25 ccm. Sollte sich etwas Chlorsilber ablösen und mithereingehen, so schadet dies nichts, da es wieder gelöst wird. Man fügt nun noch hinzu 1 ccm Natriumsulfitlösung (6), 0,5 ccm Cyannatriumlösung (4) — aus einer Bürette zu entnehmen, sehr giftig, darum nicht mit einer Pipette aufsaugen! — und 3 ccm Natriumkarbonatlösung (5).

Andererseits werden 2 Vergleichslösungen hergestellt. In je einen Meßkolben von 50 ccm Inhalt werden eingefüllt

in	Kolben a	Kolben b
Standardlösung (8)	1 ccm	2 ccm
Natriumsulfitlösung (6)	1 ccm	—
Kochsalzlösung (3)	4 ccm	4 ccm
Cyannatriumlösung (4)	1 ccm	1 ccm
Natriumcarbonatlösung (5)	6 ccm	6 ccm

Beide Kölbchen werden mit destilliertem Wasser auf ungefähr 45 ccm aufgefüllt und gut durchgemischt. Man gibt dann zu gleicher Zeit zu Kolben a und b je 1 ccm, in das 25 ccm Kölbchen, welches die Versuchslösung enthält, 0,5 ccm Harnsäurereagens (7), mischt, läßt 10 Minuten stehen, füllt dann mit Wasser bis zur Marke auf und mischt wieder. Man nimmt sofort die kolori-

metrische Ablesung vor, indem man hierbei zum Vergleich die Standardlösung benutzt, die etwas dunkler ist als die zu untersuchende Lösung.

Die Berechung ergibt sich aus folgendem. Vergleichslösung a enthält in 50 ccm 0,1 mg Harnsäure, in 100 ccm 0,2 mg Harnsäure, die Lösung b in 100 ccm 0,4 mg Harnsäure. Die 25 ccm der zu untersuchenden Lösung entsprechen 2 ccm Blut, 100 ccm dieser Lösung würden also 8 ccm Blut entsprechen. Würde also bei dem kolorimetrischen Vergleich eine Farbengleichheit der beiden Lösungen bestehen, wenn beide gleiche Schichtdicke haben, so würde bei Vergleich der Versuchslösung und der Testlösung a auch die Blutlösung 0,2 mg Harnsäure in 100 ccm Lösung oder in 8 ccm Blut enthalten. Der Harnsäuregehalt in 100 ccm Blut wäre dann 12,5 mal so hoch und entspräche in diesem Falle 2,5 mg Harnsäure in 100 ccm Blut. Würden die gleichen Verhältnisse, d. h. Farbengleichheit bei gleicher Schichtdicke, bei Anwendung der Testlösung b sich ergeben, so wäre die in 100 ccm Blut enthaltene Harnsäuremenge 5 mg. Bei Farbengleichheit und verschiedener Schichtdicke ergibt sich der Harnsäuregehalt in 100 ccm Blut unter Anwendung der oben erwähnten Formel

bei Anwendung von Testlösung a zu $\frac{s_1}{s} \cdot 2{,}5$ mg,

bei Anwendung von Testlösung b zu $\frac{s_1}{s} \cdot 5$ mg Harnsäure,

wobei wiederum s_1 die Schichtdicke der Testlösung, s die Schichtdicke der zu untersuchenden Lösung bedeutet.

Beispiel: War Testlösung a angewandt, und betrug bei gleicher Farbtiefe die Schichtdicke dieser 20 mm, die Schichtdicke der Versuchslösung 27,5 mm, so waren enthalten in 100 ccm Blut

$$\frac{20}{27{,}5} \cdot 2{,}5 = 1{,}82 \text{ mg Harnsäure.}$$

Der Harnsäuregehalt im normalen Blute beträgt bei purinfreier Ernährung zwischen 1,5 und 3 mg %.

Bestimmung der Harnsäure nach Benedict.

Prinzip: In der nach Folin-Wu enteiweißten Blutlösung (s. S. 89) wird ohne weitere Isolierung durch ein spezifisches Phosphor-Arsen-Wolframsäurereagens eine für Harnsäure charakteristische Blaufärbung erzeugt, die kolorimetrisch mit einer auf gleiche Weise behandelten Standard-Harnsäurelösung verglichen wird.

Erforderliche Reagentien: Zur Enteiweißung die S. 89 beschriebenen, ferner 1. Harnsäurereagens: 100 g reines Na-wolframat wird in einem Jenaer Literkolben in ca. 600 ccm Wasser gelöst. Dazu werden gegeben 50 g reine Arsensäure (As_2O_5), darauf 25 ccm 84 %ige Phosphorsäure und 20 ccm konzentrierte Salzsäure. Es wird 20 Minuten gekocht: man läßt dann abkühlen und füllt auf 1 l auf. 2. Cyannatriumlösung: 50 g Cyannatrium werden mit Wasser zu 1000 ccm gelöst und der gesamten Lösung 2 ccm konzentriertes Ammoniak zugefügt. 3. Standardlösung: A Stammlösung: 9 g sekundäres Natriumphosphat (Na_2HPO_4) und 1 g primäres Natriumphosphat (NaH_2PO_4) werden in 200 bis 300 ccm heißem Wasser gelöst, auf 500 ccm aufgefüllt und filtriert. Andererseits werden 0,2 g reinste Harnsäure genau abgewogen, in ein großes Jenaer Becherglas überführt, 5—10 ccm Wasser zugefügt, so daß man eine Aufschwemmung erhält, und nun die noch heiße Phosphatlösung auf die Suspension heraufgegossen, wobei die Harnsäure vollständig in Lösung geht. Man läßt erkalten, fügt 1,4 ccm Eisessig hinzu und füllt mit destilliertem Wasser auf 1000 ccm auf. Die Lösung hält sich mit etwas Toluol als Desinfiziens mindestens zwei Monate unverändert. Hieraus werden die gebrauchsfertigen Standardlösungen hergestellt (zwei Wochen haltbar), und zwar Lösung B: 25 ccm Lösung A werden in einen Meßkolben von 500 ccm hereinpipettiert, dazu 250 ccm destilliertes Wasser und 2,5 ccm konzentrierte Salzsäure gegeben, aufgefüllt auf 500 ccm. Diese Lösung enthält in 1 ccm 0,01 mg Harnsäure, in 5 ccm 0,05 mg. Lösung C: (für geringere Konzentrationen) 10 ccm Lösung A werden in einen Meßkolben von 500 ccm einpipettiert, 250 ccm destilliertes Wasser und 2,5 ccm

konzentrierte Salzsäure zugegeben und ebenfalls auf 500 mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung enthält in 1 ccm 0,004 mg Harnsäure, in 5 ccm 0,02 mg Harnsäure.

Verfahren: Bei geringen und mittleren Konzentrationen: 2 Reagenzgläser werden mit je 5 ccm Wasser beschickt, dazu kommt in das eine 5 ccm Standardlösung C, in das andere 5 ccm Blutfiltrat. In jedes kommt (aus einer Bürette) 4 ccm Natriumcyanidlösung, worauf durch Umdrehen gemischt wird. Zu jeder Probe kommt dann 1 ccm Reagens, worauf durch Umkehren wiederum gemischt wird. Beide Röhrchen werden jetzt 3 Minuten in ein kochendes Wasserbad gesetzt, danach werden die Gläser sofort zum Abkühlen in ein Glas mit kaltem Wasser eingebracht und nach längstens 5 Minuten kolorimetrisch verglichen. Mit einer Kontrolle können eine Anzahl von Proben verglichen werden. Es ist dann aber zu beachten, daß das Röhrchen, welches am längsten im Wasserbad steht, dort nicht länger als 4 Minuten, das zuletzt eingesetzte mindestens 3 Minuten bleibt.

Für größere Konzentrationen wird ebenso verfahren, mit der alleinigen Ausnahme, daß als Kontrollösung 5 ccm der Standardlösung B angewandt werden.

Die Berechnung erfolgt nach der üblichen kolorimetrischen Formel: $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$. Hierbei ist bei Anwendung der Standardlösung C $c_1 = 4$ mg in 100 ccm Blut, bei Verwendung der Standardlösung B entspricht $c_1 = 10$ mg in 100 ccm Blut.

Beispiel: Es sei zum Vergleich gewählt die Standardlösung C, die Schichtdicke der Standardlösung im Kolorimeter s_1 sei gleich 30, die der Blutfiltratlösung $s = 36$, so ergibt sich der Gehalt an Harnsäure zu $4 \cdot \frac{30}{36} = 3{,}33$ mg Harnsäure in 100 cm Blut.

Bemerkung. Größere Mengen Traubenzucker geben auch eine Reaktion mit dem Reagens. Ist der Blutzuckergehalt höher als 0,2 %, so ist von dem gefundenen Wert eine Korrektur abzuziehen, die bei einem Gehalt von

0,3 % Blutzucker 0,35 mg, bei 0,4 % Blutzucker 0,5 mg beträgt.

Es empfiehlt sich auch, für die Harnsäurebestimmung eine Enteiweißung in der Art vorzunehmen, daß auf einen Teil Blut 17 Teile Wasser, 1 Teil Wolframat und 1 Teil Schwefelsäure genommen wird. Von dem Filtrat werden dann (ohne die oben vorgeschriebene Verdünnung) direkt 10 ccm zur Analyse verwandt. Die hierdurch gewonnenen Werte sind im Durchschnitt 10 % höher als die nach dem Originalverfahren erhaltenen. Sie verdienen einen höheren Grad von Glaubwürdigkeit als jene.

Bestimmung des Kreatins und Kreatinins.

Prinzip: In den durch Enteiweißung mit Trichloressigsäure gewonnenem Blutfiltrat wird die durch Zusatz von Pikrinsäure erhaltene Färbung kolorimetrisch bestimmt und so das Kreatinin ermittelt; im anderen Teile des Filtrats wird unter erhöhtem Druck das Kreatin in Kreatinin verwandelt und darauf die Summe von Kreatin + Kreatinin in gleicher Weise kolorimetrisch bestimmt.

Erforderliche Reagentien: 1. Trichloressigsäure, 20 %ige Lösung. 2. 1 prozentige Pikrinsäure (aus reinster, eventuell wiederholt umkristallisierter Pikrinsäure herzustellen, in dunkler Flasche aufzubewahren). 3. Natronlauge: 10 %ig 4. Kreatininstandardlösung: 0,1 g reinstes Kreatinin (geeignet auch das von den Farbwerken Bayer hergestellte Ilun) wird unter Zusatz von 10 ccm n/10 HCl in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösung ist gut verschlossen lange Zeit unverändert haltbar. Zum Versuch wird hieraus (jedesmal frisch) eine 20fache Verdünnung hergestellt, indem 5 ccm auf 100 ccm verdünnt werden. 100 ccm dieser Lösung enthalten 5 mg Kreatinin, 4 ccm 0,2 mg. Man kann auch von Kreatininchlorzink ausgehen, indem man zur Herstellung der Standardlösung 0,1611 g in gleicher Weise in 100 ccm löst.

(Herstellung des Kreatininchlorzinks s. 2. Aufl. S. 95.)

In einem Zentrifugenglas werden 6 ccm Serum mit 2,4 ccm Wasser gemischt und tropfenweise unter Umrühren 3,6 ccm Trichloressigsäure (1) zugefügt. Es wird zentri-

fugiert und die erhaltene klare Lösung (ungefähr 9 ccm) abgegossen. Zur Bestimmung des Kreatinins werden 4 ccm zurückbehalten und in einen Meßkolben oder Meßzylinder a, der eine Marke bei 15 ccm hat, hereinpipettiert. Andere 4 ccm werden in ein zweites Röhrchen b, das ebenfalls eine Marke bei 15 ccm besitzt, eingebracht und, nachdem die Öffnung mit etwas Zinnfolie verschlossen worden ist, in einen Autoklaven von mindestens 5 Atm. Arbeitsdruck eingebracht und in diesem 30 Minuten auf 135 Grad (= 3 Atm.) erhitzt Man läßt abkühlen und nimmt die Lösung in dem Gläschen aus dem Autoklaven heraus. Ein drittes Röhrchen c mit derselben Einteilung wird mit 4 ccm der verdünnten Kreatininstandardlösung mit einem Gehalt von 0,2 mg Kreatinin beschickt und hierzu 1,2 ccm Trichloressigsäurelösung (1) zugegeben. Zu allen drei Röhrchen werden nunmehr je 5 ccm einer frisch hergestellten Mischung aus 25 ccm Pikrinsäurelösung (2) und 10 ccm Natronlauge (3) zugefügt. Nach 5 Minuten langem Stehen werden alle Röhrchen mit Wasser auf 15 ccm aufgefüllt, gemischt und im Kolorimeter unter Vorsatz eines Kobaltglases miteinander verglichen.

Beispiel: 1. Bestimmung des Kreatinins: in den einen Trog kommt die Testlösung (aus c), in den anderen die in gleicher Weise behandelte, nicht erhitzte Blutlösung (aus a). Es bestehe Farbengleichheit beim Stande der Versuchslösung von 60, der Vergleichslösung von 15. Entsprechend der Formel $c = c_1 \cdot \frac{s_1}{s}$, wo c_1 die Konzentration der Vergleichslösung (0,2 mg), s_1 die Schichtdicke der Vergleichslösung (15), s die Schichtdicke der Versuchslösung (60) bedeutet, ergibt sich die gesuchte Konzentration zu $c = 0{,}2 \cdot \frac{15}{60} = 0{,}05$ mg. Da dieser der Gehalt von 4 ccm Versuchslösung = 2 ccm Serum ist — durch die Enteiweißung war das Serum auf das Doppelte verdünnt worden —, berechnet sich der Gehalt in 100 ccm Serum zu $0{,}05 \cdot 50 = 2{,}5$ mg Kreatinin.

Bei der Bestimmung des Gesamtkreatinins (präformiertes Kreatinin + Kreatinin aus Kreatin) sei bei Anwendung der gleichen Kontrollösung (man läßt diese zweckmäßig einfach in ihrem Trog im Kolorimeter stehen, da im Laufe einer halben Stunde eine Farbenveränderung nicht eintritt) die Schichtdicke der Vergleichslösung 30, die der Blutlösung (aus b) 24 bei Farbengleichheit. Nach der obengenannten Formel ergibt sich die Konzentration des Kreatinins dieser Probe sinngemäß zu $0{,}2 \cdot \frac{30}{24} = 0{,}25$ mg Gesamtkreatinin. Die Menge in 100 ccm Serum wird, wie oben ausgeführt, durch Multiplikation mit 50 erhalten, so dass in 100 ccm 12,5 mg Gesamtkreatinin (Kreatinin präformiert + Kreatinin aus Kreatin) enthalten sind. Die Menge des Kreatinins aus Kreatin ergibt sich aus der Differenz der beiden Werte zu 10 mg $^0/_0$. Will man hieraus das Kreatin bestimmen, so muß letzterer Wert mit 1,27 multipliziert werden, woraus sich also ein Kreatingehalt von 12,7 mg ergibt.

Im normalen Blut der Erwachsenen beträgt der Gehalt an Kreatinin 1—2 mg $^0/_0$, an Kreatin + Kreatinin (Gesamtkreatinin) 5—6 mg $^0/_0$.

Bestimmung des Gallenfarbstoffs nach Hijmans van den Bergh.

P r i n z i p: Die Methode beruht auf der Enteiweißung des Serums mit Alkohol, wobei der Farbstoff in letzteren übergeht. Durch Zusatz von Diazoreagens wird eine Rotfärbung erzeugt, welche kolorimetrisch mit einer standardisierten Lösung von Rhodaneisen in Äther verglichen wird.

Erforderliche R e a g e n t i e n: 1. Alkohol, 99 $^0/_0$ig. 2. Diazoreagens. Dieses wird hergestellt durch Mischung von 10 ccm Diazoreagens I (5 g Sulfanilsäure werden in Wasser gelöst, 50 ccm Salzsäure, spezifisches Gewicht 1,19, zugesetzt und auf 1 l aufgefüllt) und 0,2 ccm Diazoreagens II (0,5 g Natriumnitrit werden in 100 ccm destillierten Wassers gelöst). Die Mischung ist stets frisch zu bereiten. 3. Vergleichslösung: a) Eisenlösung.

Man bereitet sich zunächst eine Stammlösung, indem man 0,1508 g Eisenalaun (reinsten) in etwas Wasser löst, 50 ccm konzentrierte Salzsäure zugibt und im Meßkölbchen auf 100 ccm auffüllt. Man erhält auf diese Weise eine unbegrenzt haltbare Eisenlösung, in welcher das Eisen $^1/_{320}$ normal ist. Aus dieser Lösung wird eine einige Monate haltbare Lösung von $^1/_{8000}$ Eisen hergestellt, indem man 10 ccm der Stammlösung mit 25 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt, das Volumen im Meßkolben auf 250 ccm auffüllt und gut mischt. b) 10%ige Rhodankaliumlösung. 4. Äther.

Die Gallenfarbstoffprobe wird, wenn nur kleine Quantitäten Serum zur Verfügung stehen, am besten mit Hilfe des Autenriethschen Kolorimeters ausgeführt; werden andere Kolorimeter benutzt, welche größere Mengen beanspruchen, so sind die angegebenen Quantitäten entsprechend zu vervielfachen.

Man bringt in ein kleines Zentrifugenrohr 1 ccm klares Serum, gibt dazu 2 ccm Alkohol und mischt durch leichtes Neigen (im Notfall kann man auch von 0,5 Serum ausgehen). Hierdurch wird das Eiweiß koaguliert; man zentrifugiert stark, so daß die überstehende Flüssigkeit möglichst klar wird. Man entnimmt dann von dieser mit einer Pipette 1 ccm, bringt ihn direkt in den Trog des Autenriethschen Kolorimeters, fügt dazu 0,25 ccm der Diazoreagenzmischung (2) und gibt noch 0,5 ccm Alkohol dazu. Dieser Zusatz löst die Fettsäuren auf, die in vielen Fällen die Flüssigkeit leicht trüben. Die Vergleichsflüssigkeit wurde bereits vorher aus den oben beschriebenen Komponenten folgendermaßen hergestellt. Man bringt in einen kleinen Scheidetrichter 3 ccm der bereits verdünnten Eisenlösung (mit der Pipette abzumessen) und gibt dazu genau 3 ccm der Rhodankaliumlösung. Hierzu fügt man 12 ccm Äther und schüttelt unter Abkühlen unter der Wasserleitung gut aus, wobei das gebildete Rhodaneisen in den Äther übergeht und diesen rötlich färbt. Die auf diese Weise erhaltene ätherische Lösung von Rhodaneisen entspricht in ihrer Intensität genau einer Gallenfarbstoffmenge, welche $^1/_{200000}$ Bilirubin in der angewandten Flüssigkeit entspricht. Man

macht die kolorimetrische Ablesung und berechnet nun aus dieser den Bilirubinwert des Serums auf Grund folgender Überlegung.

Durch den Zusatz von 2 ccm Alkohol zu 1 ccm Serum wurde das Volumen der Flüssigkeit annähernd auf das Dreifache gebracht, in Wirklichkeit nur auf $^{20}/_{7}$ des ursprünglichen Volumens, wenn man die Kontraktion berücksichtigt, die durch Zusatz des Alkohols entstand. Das Präzipitat ist so gering, daß es vernachlässigt werden kann, wie bei allen Enteiweißungen. Von diesem Volumen wurde 1 ccm genommen, der durch den Zusatz von 0,25 ccm Diazoreagens und 0,5 ccm Alkohol auf 1,75 ccm, also auf $^{7}/_{4}$ weiter verdünnt wurde. Wir haben also zwei Verdünnungen ausgeführt, als deren Produkt $\left(\frac{20}{7} \cdot \frac{7}{4}\right)$ eine 5fache Verdünnung resultiert. Würde bei gleicher Schichtdicke also gleiche Farbtiefe bestehen, so würde der Gehalt des Troges mit der Versuchsflüssigkeit an Bilirubin $^{1}/_{200\,000}$ oder 0,5 mg in 100 ccm entsprechen, der Gehalt des Serums, von dem man ausgegangen ist, dem 5fachen dieses Wertes, also $^{1}/_{40\,000}$ oder 2,5 mg in 100 ccm. Findet sich gleiche Farbtiefe bei einer anderen Stellung des Keiles, so ist diese Zahl mit dem Quotienten $\frac{\text{Schichtdicke der Vergleichslösung}}{\text{Schichtdicke der Versuchslösung}}$ zu multiplizieren. Verwendet man das Autenriethsche Kolorimeter in der gewöhnlichen Form, so ist die Schichtdicke der Versuchslösung mit 100 anzusetzen, die Schichtdicke der Vergleichslösung mit 100 — n, wobei n die Ablesung an der Skala des Apparates bedeutet, welche bei gleicher Farbtiefe angezeigt wird. Hat der Apparat Korrekturen, und entsprechen die Werte nicht genau, so sind diese Korrekturen natürlich zu berücksichtigen. Bei obiger Berechnung ist vorausgesetzt, daß der Autenriethsche Apparat bei einer Schichtdicke gleich der des Troges die Ablesung 0, bei geringster die Ablesung 100 gibt. Es gibt auch fertig geeichte Keile, bei deren Benutzung man den Gallenfarbstoffgehalt auf einer mitgegebenen Tabelle ablesen kann.

Beispiel: Es seien angewandt 1 ccm Serum, in der oben beschriebenen Weise behandelt, als Vergleichslösung die ebenfalls beschriebene ätherische Rhodaneisenlösung. Gleiche Farbtiefe im Autenriethschen Kolorimeter sei erreicht bei einer Skalenablesung von 60. Es ergibt sich dann die Konzentration des Bilirubins im Serum zu

$$0{,}5 \cdot \frac{100 - 60}{100} \cdot 5 = 1 \text{ mg in } 100 \text{ ccm.}$$

Handelt es sich um Sera, die außerordentlich reich an Bilirubin sind, so muß man, ehe man die Enteiweißung und die weitere Behandlung vornimmt, mit 0,9%igen NaCl-Lsg. auf das Doppelte oder das Mehrfache des Volumens genau verdünnen; der erhaltene Wert ist dann noch mit dieser Verdünnungszahl zu multiplizieren. Der Gallenfarbstoffgehalt des normalen Blutes liegt unter 0,5 mg %.

Die Methode gibt alles im Serum enthaltene Bilirubin an: es sei jedoch an dieser Stelle bemerkt, daß Hijmans van den Bergh mit einer qualitativen Probe zwei Arten der Bilirubinreaktion unterscheidet: er spricht von einer „direkten“ Reaktion, wenn bei Verdünnung des Serums mit der doppelten Menge Wasser und Zusatz von $^1/_4$ bis $^1/_2$ Vol. Reagens eine Reaktion sofort, höchstens in 30 Sekunden auftritt, und einer „indirekten Reaktion“, wo diese erst nach 2—4 Minuten beginnt und erst nach längerer Zeit ihre größte Intensität erreicht. Diese Reaktion tritt ebenso wie die „direkte“ unter Zusatz von Alkohol fast momentan und maximal auf: bei der beschriebenen quantitativen kolorimetrischen Prüfung bestehen also diese Unterschiede nicht. Die qualitative „direkte“ Reaktion ist typisch für Sera von Patienten mit Stauungsikterus, während alle anderen Sera von Menschen mit lokal gebildetem Bilirubin die „indirekte“ Reaktion geben.

Blutuntersuchung durch Gasanalyse.

Die hier zu beschreibenden gasanalytischen Messungen beruhen auf der Messung des freigesetzten Gases mit Hilfe eines Manometers, welches das Gefäß mit der zu

analysierenden Lösung und ein gleich großes Kontrollgefäß mit gleichem Flüssigkeitsinhalt verbindet. Sie werden im großen oder kleinen Barcroftschen Apparat vorgenommen[1]. Der größere (s. Abb. 16) besteht aus zwei Flaschen von Eiform gleicher Größe, die ungefähr 25 ccm

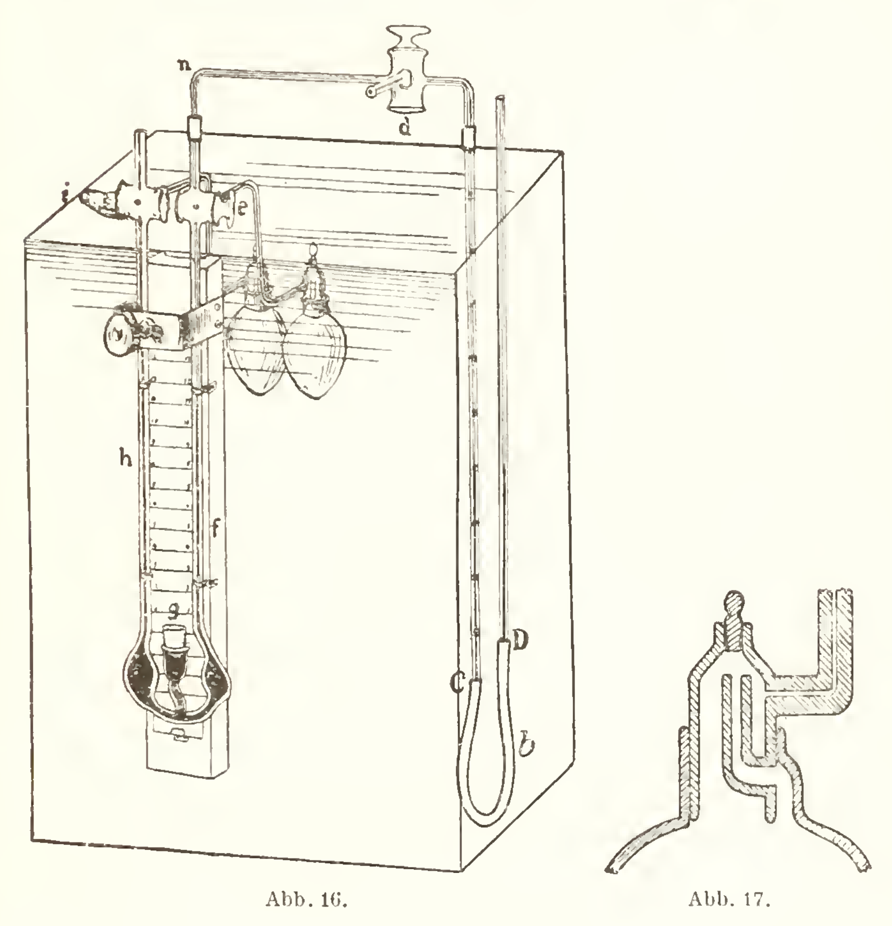


Abb. 16. Abb. 17.

enthalten und auf 0,1 ccm übereinstimmen müssen. Diese dienen zur Aufnahme der zu analysierenden Substanz. Verbunden werden diese Flaschen durch ein Manometer (h f), das aus einer Kapillare von ca. 1 mm Durchmesser besteht, deren beide Enden durch Dreiweghähne (i, e) entweder mit der Außenluft oder den

[1]) J. Barcroft, The respiratory function of the blood. Cambridge 1914.

Flaschen kommunizieren. Die Verbindung dieser mit dem Manometer erfolgt durch ein Kopfstück, das folgendermaßen konstruiert ist (s. Abb. 17 nach Straub). In die Kuppel, auf welche die Flasche von unten her luftdicht aufgesteckt werden kann, ist ein kleines Glasrohr einge-

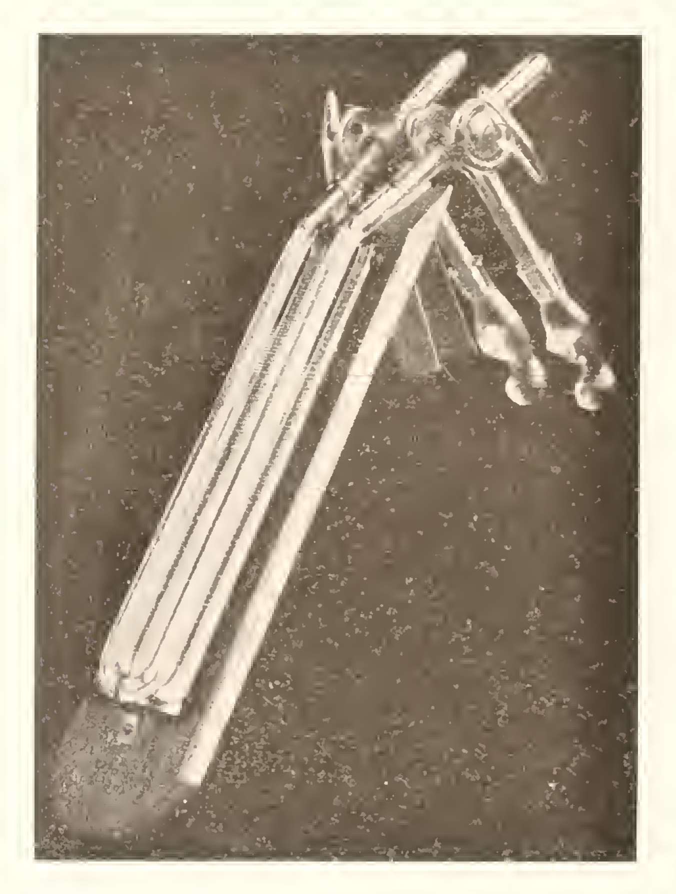


Abb. 18.

schmolzen, das ca. 0,3 ccm Flüssigkeit faßt. Das untere Rohrende mündet durch ein Loch frei auf die Außenseite der Kuppel. Wird die Flasche aufgesteckt, so ist bei gewöhnlicher Stellung dieses Loch durch den Flaschenhals verschlossen. An einer Stelle jedoch hat der Flaschenhals eine Ausbuchtung; dreht man die Flasche so, daß die Öffnung des Rohres auf diesen Teil

fällt, so kann Flüssigkeit, welche in dem Rohr enthalten war, ausfließen und sich mit der in der Flasche bereits vorhandenen mischen. Oben hat die Kuppel eine mit einem Glasstopfen gasdicht verschließbare Öffnung, durch welche man das Rohr von oben her mit Hilfe einer feinen Pipette füllen kann.

Das Manometer liegt auf einer Skala aus Spiegelglas, so daß bei der Ablesung parallaktische Fehler vermieden werden. Das Manometerrohr, das ganz rein und trocken sein muß, wird mit Nelkenöl gefüllt, und zwar verwendet man zum Füllen das untere Mittelstück g, in welches man, nach Herstellung der Kommunikation der

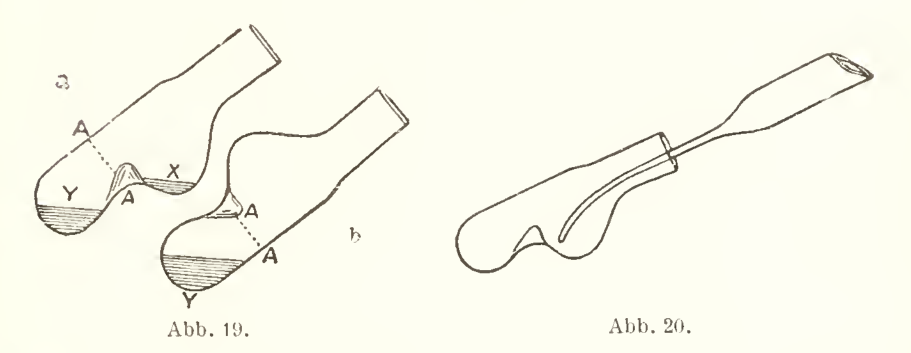


Abb. 19. Abb. 20.

Manometerenden mit der Außenluft, die Sperrflüssigkeit einfüllt. Man gibt so viel Öl herein, daß nach Verschluß des Stopfens bei g (Gummistopfen, noch mit Paraffin zu dichten) das Niveau ungefähr in halber Höhe der Skala steht. Neuere Apparate haben hier ein Steigrohr, das ungefähr in halber Höhe mit einem Hahn verschlossen wird. Über diesen befindet sich eine trichterähnliche Ausbuchtung, durch welche das Einfüllen des Öls erfolgt.

Für noch kleinere Mengen dient der Apparat Abb. 18. Er besteht aus einem Manometer von 0,5 mm Durchmesser, das ebenfalls auf einer Spiegelglasskala montiert ist. Am oberen Ende beider Schenkel sind ebenfalls Dreiwegehähne angebracht, so daß das Manometer einmal mit der freien Luft, das andere Mal mit einem Ansatzstück korrespondiert, an das eine kleine Flasche (Abb. 19) durch einen Schliff aufgesetzt werden kann. In

ihre untere Höhlung y wird das zu bestimmende Material eingefüllt, in die obere der Zusatz; durch einfaches Umdrehen der Flasche am Ansatzstück Abb. 19 b wird die obere Flüssigkeit in die untere hereingegossen, so daß die Reaktion vor sich geht. Die beiden Flaschen müssen ganz gleich sein, was sich ja aus der in Anwendung kommenden Differenzmethodik als unumgänglich ergibt. Zum Füllen der oberen Höhlung benutzt man zweckmäßig etwas rund gebogene Pipetten (Abb. 20).

Die Füllung auch dieses Apparates erfolgt mit Nelkenöl oder mit einer Mischung aus 80 Teilen Amylalkohol und 20 Teilen reinstem Olivenöl. Man gibt mit einer Kapillarpipette, die man bis zu der Verengerung des Rohres in das Manometerrohr der einen Seite (x in Abb. 21) einführt, etwas Öl herein, während der Hahn des anderen Manometerrohrs geschlossen ist. Nach Herausziehen der Pipette öffnet man diesen Hahn vorsichtig so weit, daß das Öl in das Kapillarrohr eintreten kann und gerade noch die untere Biegung füllt. Man schließt den Hahn wieder und entfernt nun mit Hilfe von Fließpapier den Überschuß von Öl, der sich noch in den weiteren Teilen befinden sollte, sehr sorgfältig; man öffnet dann den Hahn der anderen Seite wiederum, worauf sich das Öl in den beiden Schenkeln horizontal einstellt und die Menisken ungefähr in der Mitte der Skala liegen.

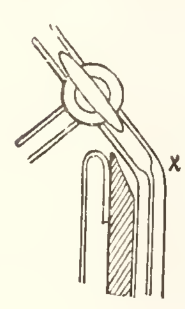


Abb. 21.

Wenn man auch für die Barcroftschen Apparate eine Konstante für jede Art der Bestimmung eruieren kann, indem man z. B. die Menge Sauerstoff mißt, die aus einer gewissen Menge Wasserstoffsuperoxyd entsteht, oder den bei der Zersetzung einer bestimmten Menge Harnstoff entstehenden Stickstoff, so empfiehlt es sich doch eher, für die benutzten Apparate eine Konstante festzustellen, die man für alle Zwecke gebrauchen kann, vorausgesetzt, daß die Flüssigkeitsmenge in den Flaschen die gleiche bleibt. Diese Konstante muß aussagen, wieviel Millimeter Ausschlag einer bekannten Gasmenge entsprechen. Am besten eignet sich hierfür die Methode von Münzer und Neumann. Diese

Bestimmung erfolgt folgendermaßen[1] (s. Abb. 16): An den einen Schenkel des Manometerrohrs, für dessen Flasche man die Konstante bestimmen will, wird durch ein zweimal rechtwinklig gebogenes Kapillarstück, das durch einen Hahn d mit der Außenluft kommunizieren kann, und durch zwischengeschalteten Druckschlauch eine Meßpipette C, in $^1/_{100}$ ccm geteilt und genau kalibriert (wenn man nicht eine solche Pipette erhalten kann, muß man sich eine vorhandene selbst eichen, damit man genau weiß, welchem Volumen ein Teilstrich entspricht) angesetzt, deren anderes Ende durch einen Druckschlauch b mit dem Niveaurohr D verbunden ist. Meßpipette und Niveaurohr dürfen nicht kapillar sein und genau gleiche innere Weite haben. In C und D und das verbindende Schlauchstück wird Wasser eingefüllt, so daß die Pipetten ungefähr bis zur halben Höhe gefüllt sind. Die Flaschen werden vorher mit der Menge Flüssigkeit (Wasser) gefüllt, die später beim Versuch gebraucht wird. Die Hähne i, e, d werden geöffnet, D wird so weit gesenkt — die ganze Apparatur befindet sich dauernd im Wasserbad —, daß der Meniskus im unteren Teile von C steht. Nachdem sich im ganzen Apparat Atmosphärendruck eingestellt hat, wird durch Schließen der Hähne i und d die Verbindung dieser mit der Außenluft aufgehoben; während der Manometerschenkel f andauernd durch Hahn e mit dem Kapillarstück n kommuniziert, der Meniskusstand in den beiden Schenkeln h und f und der Eichpipette C notiert; darauf wird das Niveaurohr D gehoben, bis im Manometer die gewünschte Niveaudifferenz auftritt, Hahn e wird geschlossen und D so weit gesenkt, daß der Wasserstand in ihm und C gleich hoch ist. Die Differenz der beiden Pipettenablesungen vor und nach dem Versuche gibt das Volumen des eingepreßten Gases unter den herrschenden Temperatur- und Druckverhältnissen. Diese Zahl, dividiert durch den Niveauunterschied im Manometer, liefert die Konstante.

Beispiel: Birnenvolumen (Raum der Birne + Kapillarschaltung bis zum Nelkenöl) 24,33 ccm (das Volumen der

[1]) Münzer u. Neumann, Bioch. Ztschr. Bd. 81, S. 319.

Birne leer war 29,4 ccm, von dem der Wasserinhalt von 5,07 ccm abging).

Eingepreßtes Luftvolumen cmm	Höhendifferenz im Manometer mm	Konstante
106	29,8	3,56
138	38,9	3,55
174	48,6	3,58
264	74,8	3,53
294	82,2	3,58
267	75,9	3,52

Mittelwert von k = 3,55.

Bei Berechnungen ist folgendes zu beachten:

Die Konstante ist unabhängig von der Temperatur, abhängig dagegen — außer von dem Flüssigkeitsinhalt der Flaschen — vom Luftdruck. Für genaue Messungen ist es zweckmäßig, k für verschiedene Drucke zu bestimmen und die Werte graphisch aufzuzeichnen. Man erhält eine gerade Linie, aus der man den gesuchten Wert ohne Schwierigkeit entnehmen kann.

Für andere Füllungsverhältnisse muß die Konstante natürlich neu bestimmt werden. Auch hier ist es zweckmäßig, die Konstante für verschiedene Füllungen zu bestimmen und die Resultate graphisch aufzutragen. Man erhält dann ebenfalls eine gerade Linie, aus der man die gesuchten Werte für k bei verschiedenem Flüssigkeitsgehalt entnehmen kann.

Die Bestimmung für k ist in der gleichen Weise für die zweite Flasche zu wiederholen. Sind die Konstanten für die beiden Flaschen gleich oder fast gleich, was bei gut gearbeiteten Apparaten die Regel ist, nimmt man das Mittel für beide Flaschen, sonst muß für jede Flasche ihre Konstante eingesetzt werden.

Die Eichung des kleinen Barcroftschen Apparates erfolgt in genau der gleichen Weise.

Bei den später zu schildernden Versuchen gibt das Produkt Niveaudifferenz · Konstante bei dem geeichten Apparat das Volumen des in der mit einer bestimmten Menge Flüssigkeit beschickten Birne entwickelten Gases

unter den herrschenden Luftdruck- und Temperaturverhältnissen an. Die Reduktion dieses Wertes auf 0 Grad und 760 mm erfolgt nach der bekannten Formel $v_0 = \frac{v\,p}{760\,(1 + \alpha\,t)}$; hierbei bedeutet v das bereits mit Hilfe der Konstanten festgestellte Volumen, p den Luftdruck, t die Temperatur und α den Ausdehnungskoeffizienten der Gase $= \frac{1}{273}$.

Die gasanalytischen Messungen erfordern eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen. Alle Hähne sowie die Glasschliffe zum Ansatz der Flaschen sowie sonstige Schliffe müssen gut gefettet werden, damit kein Gas auf falschem Wege entweichen kann. Flaschen usw. müssen vor der Beschickung mit den Lösungen ganz trocken sein. Die Füllung beider Flaschen muß stets gleich sein, da bei verschiedenem Volumen sich die Konstante ändert. Zum Abmessen müssen genau kalibrierte Pipetten verwendet werden, sie müssen in jedem Ausmaß bis zum kleinsten (0,1 ccm geteilt in 0,001 ccm) vorhanden sein.

Modifikation der Gasanalyse nach Barcroft von Verzár.

Um die Bestimmung der „Konstanten" bei den Barcroftschen Apparaten, welche immerhin einige Schwierigkeiten machen kann, zu vermeiden, hat Verzár folgende Modifikation angegeben (Abb. 22).

Die eine Seite des Barcroftschen Manometers ist mit Hilfe eines gebohrten Vierwegehahnes und einer Gummiverbindung mit einer Pipette verbunden, welche 0,3 ccm (300 cmm), sehr genau in 0,001 cmm graduiert (erst zu eichen!), faßt. Diese Pipette erhält an ihrem unteren Teil eine Fortsetzung in Form eines zweiten, mit ihr U-förmig verbundenen Schenkels. Dieses U-förmige Rohr wird ebenso wie das Manometer des Barcroft-Apparates mit Öl gefüllt. Der nicht mit dem Manometer verbundene Schenkel des U-förmigen Rohres trägt oben eine Gummikappe, welche durch eine Schraube mehr oder weniger zusammengequetscht werden kann. Verzár verbindet

diese Schraube mit Hilfe eines wagerechten Stückes mit der zweiten Schraube bei den älteren Modellen der Barcroft-Apparate, welche in Verbindung mit dem Einfüllschenkel des Manometers steht und das Niveau in diesem zu verstellen gestattet. Durch die am äußeren Schenkel des U-Rohrs vorhandene Schraube kann man in der 0,3-ccm-Pipette das Ölniveau beliebig verstellen. Das Prinzip des Arbeitens mit dem Apparat ist das folgende: Man läßt in üblicher Weise im Barcroft-Manometer eine Niveaudifferenz entstehen und gleicht dieselbe durch Veränderung des Öl-Niveaus in der 0,3-ccm-Pipette aus. Die Differenz zwischen dem Stand des Öles in der Pipette vor und nach dem Versuch ergibt direkt die entwickelten bez. absorbierten Kubikmillimeter Gas.

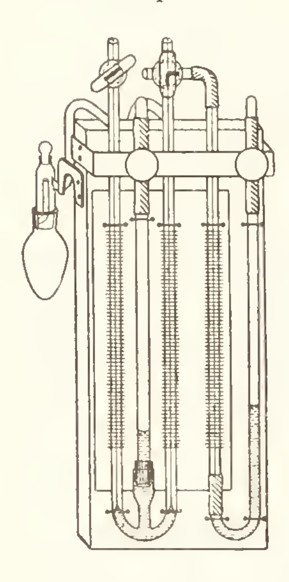


Abb. 22.

Man arbeitet mit dem Apparat auf folgende Weise. Der rechte Hahn (also der Vierwegehahn) steht zunächst |__|; in dieser Lage wird das Pipettenniveau bei Luftdruck eingestellt. Dann wird er ‾| gedreht und nun das Differentialmanometer, welches auch durch den anderen Hahn mit der Außenluft kommuniziert, bei Luftdruck eingestellt. Die Füllung der eiförmigen Ansatzflaschen, die genau gleichen Inhalt haben müssen, erfolgt mit gleichen Mengen Flüssigkeit, und zwar kommt stets in die der Meßpipette benachbarte Flasche die Versuchslösung. Ist nach 5 Minuten Verweilens im Wasserbad Temperaturausgleich erfolgt, was durchaus nach den früher erörterten Prinzipien geschieht, wird der linke Hahn des Barcroft-Apparates zugedreht und der rechte /\ gestellt, so daß er in keiner Richtung, weder nach dem Manometer noch nach der Pipette hin geöffnet ist. Jetzt werden die Stellungen des Öles in den beiden Manometerrohren und in der Pipette abgelesen und notiert. Darauf wird in üblicher Weise durch Schütteln bzw. Zu-

fließenlassen der betreffenden Flüssigkeit die Analyse ausgeführt, wobei im Differentialmanometer natürlich eine Druckdifferenz entsteht. Man stellt den Vierwegehahn nun ┌, daß Differentialmanometer und Pipette miteinander verbunden sind, und dreht jetzt die Schraube, welche das mit der Meßpipette kommunizierende U-Rohr abschließt so lange, bis in den Schenkeln des Differentialmanometers der gleiche Stand erreicht ist, wie er vor der Anstellung der Analyse bestand, also im allgemeinen gleich hoher Stand in den beiden Schenkeln. Es wird nunmehr der Stand des Öles an der Meßpipette abgelesen: die Differenz zwischen Ablesung vor Anstellung des Versuches und nach Versuch gibt direkt das entwickelte Gasvolumen an.

Die anfängliche Einstellung des Ölniveaus in der Meßpipette richtet sich danach, ob man eine Gasbildung oder eine Gasabsorption erwartet. Im ersteren Falle ist das Ölniveau mit Hilfe der rechten Schraube auf den oberen Teil der Skala einzustellen, bei erwartetem Gasverbrauch dagegen auf den unteren Teil der Skala der Meßpipette[1]).

Man kann mit dem Apparat auch, wenn nötig, Gasvolumina bestimmen, welche größer sind, als der Pipettenskala entspricht. Das ist z. B. möglich bei CO_2-Bestimmungen, wenn eine größere Blutmenge genommen wurde, als 300 cmm CO_2 entspricht. In solchem Falle, der jedoch besser vermieden wird und in dem es grundsätzlich zweckmäßig ist, die Bestimmung mit einer geringeren Blutmenge nochmals zu wiederholen, kann man sich so helfen, daß man, nachdem zuerst so viel Luft ausgetrieben wurde, daß das Öl in der Pipette bis zum unteren Skalenrand reicht, dann den Hahn └ stellt, das Öl in der Pipette wieder bis zum oberen Skalenrand hebt, den Hahn wieder ┌ stellt, noch einmal Gas austreibt, bzw. das so oft wiederholt, bis das Differentialmanometer keine Druckdifferenz mehr zeigt (Bioch. Ztschr. 151, 246 (1924]).

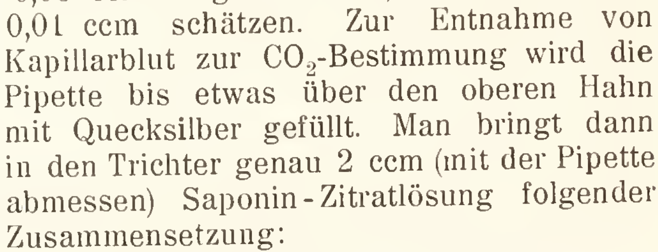
Wie Verzár besonders hervorhebt, ist für die Untersuchung von Blut durch Gasanalyse einerseits eine Verhinderung der Gerinnung erforderlich, andererseits muß das Blut mit dem Gasgehalt aufbewahrt werden, mit dem es entnommen worden ist. Für die Entnahme

---

[1]) Eine zweckmäßige Apparatur nach dem Prinzip von Verzár wird von M. J. Goldberg & Söhne, Berlin-Charlottenburg 2 hergestellt.

des Kapillarblutes zur CO_2-Bestimmung — die Methode läßt sich sinngemäß auch für anderes Blut verwenden — wird nach Verzár folgendermaßen verfahren.

Abbildung 23 zeigt eine Trichterpipette, deren zwischen den beiden Hähnen gelegener Teil 4 ccm enthält, welche in Teile von 0,05 ccm eingeteilt sind; man kann noch



0,01 ccm schätzen. Zur Entnahme von Kapillarblut zur CO_2-Bestimmung wird die Pipette bis etwas über den oberen Hahn mit Quecksilber gefüllt. Man bringt dann in den Trichter genau 2 ccm (mit der Pipette abmessen) Saponin-Zitratlösung folgender Zusammensetzung:

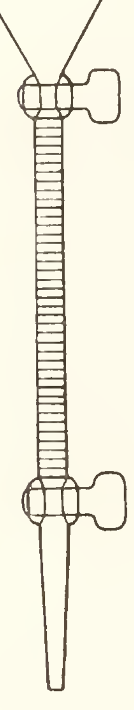


Abb. 23.

Ammoniak 25%ig	2,0 ccm
Natriumzitrat	5,0 g
Saponin	0,5 g
Aqua destillata ad	100 ccm.

Darüber schichtet man ungefähr 1 ccm Paraffinöl. Der Finger wird mit Äther abgewaschen, mit der Frankeschen Nadel ein Einstich gemacht und die Fingerkuppe sofort in die Lösung unter das Paraffin getaucht. Der Arm soll dabei herabhängen. Man läßt im allgemeinen 0,3—0,6 ccm Blut zufließen. Durch vorsichtiges Rühren mit einem Glasstäbchen kann man die Mischung des Blutes mit der Lösung beschleunigen. Man öffnet nun zuerst den oberen Hahn, dann vorsichtig den unteren und läßt das Quecksilber solange abfließen, bis die ganze wäßrige Lösung in die Skala zwischen Quecksilber- und Paraffinölmeniskus fällt. Man liest nun die Flüssigkeitsmenge zwischen den beiden Menisken ab. Der Wert, abzüglich 2 ccm der angewandten Zitratlösung entspricht der aus dem Finger gewonnenen Blutmenge. Man läßt dann vorsichtig das Quecksilber abfließen, bis die Blutlösung am Ende der Pipette erscheint. Man nimmt nun eine Birne des Gasanalyseapparates, gibt in diese eine mit der Pipette gemessene Menge Saponinlösung (1 oder 2 ccm) und schichtet

unter sie die Blutlösung, indem man diese aus der Pipette solange zufließen läßt, bis das Paraffin am Auslauf erscheint. Da man die Menge der Blutlösung vorher abgelesen hat, weiß man nun genau, wieviel Flüssigkeit in der Birne enthalten ist, und muß nun in die andere Birne genau die gleiche Menge von Saponinlösung und Wasser hereintun. Die Analyse wird nunmehr in der beschriebenen Weise durchgeführt.

Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Blute.

Prinzip: Ferrizyankalium setzt in schwach alkalischer Lösung aus lackfarben gemachtem Blut den gesamten Sauerstoff in Freiheit.

A. Bestimmung des Sauerstoffgehaltes in mit Sauerstoff gesättigtem Blut.

Notwendige Reagentien: 1. Ferrizyankaliumlösung, kalt gesättigt, frisch hergestellt, 2. Ammoniaklösung (4 ccm konzentrierte Ammoniaklösung werden mit destilliertem Wasser auf 1 l verdünnt).

a) Mit dem größeren Apparat (Konstante für 3,2 ccm muß vorher bestimmt sein): Man gibt in jede eiförmige Flasche 2 ccm Ammoniaklösung und mit einer Pipette, die man bis auf den Boden führt, 1 ccm defibriniertes, frisches, gründlich mit Luft durchgeschütteltes und kurz vor der Anwendung aufgeschütteltes Blut unter die Ammoniaklösung. Man schüttelt beide Flaschen gut um, bis das Blut ganz hämolysiert ist. Zugabe eines Körnchen Saponin befördert die Hämolyse. In das eine eiförmige Gefäß werden 0,2 ccm destilliertes Wasser zugefügt und die beiden gut eingefetteten Flaschen angesetzt. In die Kuppel des anderen Gefäßes bringt man 0,2 ccm Ferrizyankaliumlösung, wobei die Flasche so angesetzt sein mußte, daß die Lösung nicht zum Blut fließen kann, daß aber durch eine kleine Drehung der Ausfluß freigegeben wird. Man hängt den Apparat in das Wasserbad und öffnet und schließt die Hähne so lange, bis der Stand der Menisken sich nicht mehr ändert. Man notiert den Stand, stellt die Hähne so, daß das Manometer mit den Flaschen kommuniziert und bringt durch eine Drehung der be-

treffenden Flasche die Ferricyankaliumlösung zum Blut. Man schüttelt den ganzen Apparat, nachdem man ihn aus dem Wasser herausgenommen hat, mit der Hand gründlich durch, hängt ihn dann wieder ins Wasserbad, läßt dessen Temperatur annehmen, liest die Menisken ab, nimmt wieder heraus, schüttelt wieder, hängt wieder in das Wasserbad, liest wieder ab und wiederholt dies, bis die Einstellung die gleiche bleibt. Die Differenz der Menisken abzüglich der eventuell vor dem Schütteln vorhandenen Differenz multipliziert mit der Konstante, die aber für die gleiche Füllung (hier 3,2 ccm) berechnet sein muß, ergibt den gesuchten Wert, der nun noch nach der oben angegebenen Formel korrigiert werden muß.

b) Mit dem kleinen Apparat: In den unteren Teil y der beiden Flaschen wird 0,2 ccm Ammoniaklösung eingefüllt, darunter je 0,1 ccm des vorbereiteten Blutes geschichtet. Man mischt gut um, bis das Blut ganz lackfarben ist, gibt dann in die obere Mulde x der einen Flasche mit der gebogenen Pipette 0,05 ccm Ferrizyankaliumlösung, in die andere 0,05 ccm Wasser, setzt beide Flaschen an, hängt in das Wasserbad und stellt den Meniskenstand fest, nachdem der Apparat die Wassertemperatur angenommen hat (s. oben). Man dreht dann das Gefäß mit der Ferrizyankaliumlösung so, daß die Mulde nach oben steht und die Ferrizyankaliumlösung in das Blut fließt (Abb. 19). Man schüttelt wieder 2 Minuten lang, hängt in das Wasserbad, mißt die Differenz, schüttelt wieder und verfährt genau wie oben beschrieben. Sobald sich der Meniskenunterschied nicht mehr ändert, wird abgelesen und in der oben beschriebenen Weise die Gasmenge festgestellt.

Beispiel: Manometerstand nach Eintritt des Temperaturgleichgewichtes:

links	rechts	Differenz
120 mm	119,5 mm	0,5 mm
nach wiederholtem Schütteln (gleichbleibend)		
91 mm	148,5 mm	57,5 + 0,5 = 58 mm

Konstante k = 3,03 (für die untersuchte Flüssigkeitsmenge)
Volumen v = 58 · 3,03 = 0,176 ccm.

Wenn der Versuch bei 15 Grad und 755 mm ausgeführt wurde, ergibt die Reduktion auf 0 Grad und 760 mm (nach Formel auf S. 145).

$$v_0 = 0{,}176 \cdot \frac{755}{760 \cdot 1{,}055} = 0{,}166 \text{ ccm.}$$

Dieses Volumen ist noch zu reduzieren, wenn die verwandten Pipetten auf einen anderen als den abgelesenen Gehalt geeicht wurden.

Das Verfahren dient zugleich zur Hämoglobinbestimmung im Blut; da 1 ccm Blut mit einem Hb-Gehalt von 100 % 0,185 ccm Sauerstoff abgibt, kann man aus der Menge des abgegebenen O_2 auf den Hb-Gehalt des Blutes schließen. In obigem Beispiel waren 0,166 ccm O_2 abgegeben. Aus der Gleichung $185 : 100 = 166 : x$ folgt ein Hb-Gehalt von 89,6 %.

B. Bestimmung der Differenz des Sauerstoffgehaltes im arteriellen und venösen Blut.

Für diese Bestimmung muß das Blut aus der Arterie und Vene so entnommen werden, daß es ohne Berührung mit der Luft unmittelbar in die Fläschchen des Apparates überführt werden kann. Hierzu wird es mit Spritzen, die für die betreffende Menge geeicht sind, direkt aus der Vene bzw. Arterie entnommen: durch Einbringen einer kleinen Menge (2—3 mg) feinst gepulverten Kaliumoxalats in die Kanüle wird eine Gerinnung des aufgesaugten Blutes verhindert.

Man bringt in jede Flasche 2 ccm bzw. 0,2 ccm Ammoniaklösung, nachdem man dafür gesorgt hat, daß jede Spur von Ferrizyankalium entfernt ist. Nachdem man die Kanüle außen gut abgewischt hat, schichtet man unter die Ammoniaklösung der einen Seite 1 bzw. 0,1 ccm arterielles Blut, auf der anderen Seite die gleiche Menge venöses Blut, indem man die Kanüle bis auf den Boden der Flasche führt. Nachdem man die Flaschen fest angesetzt hat, stellt man, wie vorher beschrieben, nach Annahme der Temperatur des Wasserbades die Stellung des Manometers fest, nimmt dann unter Beibehaltung der Kommunikation der Flaschen mit dem Manometer den

Apparat aus den Wasser heraus, schüttelt eine Minute lang, hängt in das Wasserbad ein, liest ab, schüttelt wiederum, hängt nochmals ein und wiederholt die Ablesung, bis sie konstant geworden ist. Die gefundene Manometerdifferenz — unter Berücksichtigung einer etwaigen, vor dem Ausschütteln vorhandenen — multipliziert mit der Konstante k für das angewandte Volumen ergibt die Differenz zwischen Sauerstoffgehalt des arteriellen und venösen Blutes.

Die Methode mißt nicht nur den Sauerstoff des Hämoglobins, sondern den Unterschied des gesamten Sauerstoffs der beiden Proben. Ferner wird stillschweigend angenommen, daß arterielles und venöses Blut die gleiche Sauerstoffkapazität haben, was nicht immer der Fall ist.

C. Bestimmung der prozentualen Sauerstoffsättigung von Blut.

Diese wird nicht direkt ermittelt, sondern aus der zur vollständigen Sättigung fehlenden Menge. Ist A die Menge Sauerstoff, welche das Blut enthält, C die gesamte Sauerstoffkapazität und B die zur Sättigung fehlende Menge, so ist die prozentuale Sauerstoffsättigung gleich $100 \cdot \frac{A}{C}$, oder, da $A = C - B$ ist, gleich $100 \cdot \frac{C-B}{C}$.

B wird bestimmt, indem die ganz trockenen und von jeder Spur von Ferrizyankalium freien Flaschen mit 2 bzw. 0,2 ccm Ammoniaklösung gefüllt werden, 1 bzw. 0,1 ccm Blut, und zwar in die eine Flasche durch Schütteln mit Sauerstoff vollständig gesättigtes, in die andere Flasche unbehandeltes unterschichtet wird. Ferrizyankalium wird hier nicht zugesetzt. Die Flaschen werden angesetzt, die Hähne geschlossen, nachdem im Wasserbad konstante Temperatur eingetreten ist, so daß die Manometerablesung unverändert bleibt. Darauf wird gründlich durchgeschüttelt, wobei die ungesättigte Blutprobe aus der Luft ihres Fläschchens Sauerstoff aufnimmt, und in üblicher Weise die Differenz des Manometerstandes bestimmt. Die Manometersäule steigt unter diesen Verhältnissen natürlich auf der Seite des ungesättigten Blutes.

Der Apparat wird dann aus dem Wasserbad herausgenommen und die Hähne zur Außenluft geöffnet, bei dem größeren Apparat — selbstverständlich nach entsprechender Stellung der Flaschen, daß nichts hereinfließen kann — in die eine Kuppel 0,2 ccm, bei dem kleinen Apparat in die eine obere Mulde 1 Tropfen Ferrizyankaliumlösung gegeben. In die zweite Flasche kommt die gleiche Menge Wasser. Nach Feststellung des Manometerstandes und Regulierung desselben durch wiederholtes Öffnen und Schließen der Hähne zur Außenluft wird die Verbindung des Manometers zum Flascheninhalt hergestellt, nach konstanter Einstellung durch Drehung der Flaschen die Ferrizyankaliumlösung mit dem Blut gemischt, wie vorher angegeben, 2 Minuten stark geschüttelt, in das Wasserbad eingehängt, die Manometerdifferenz abgelesen und diese Prozedur so lange wiederholt, bis die beiden letzten Ablesungen miteinander übereinstimmen.

Berechnung: Da es sich um eine Differenzmethode handelt, kann jede Reduktion mit Hilfe der Konstanten sowie auf Barometerdruck und Temperatur unterbleiben. War bei der Differenzbestimmung von B die Manometerdifferenz b mm, bei der Bestimmung von C c mm, so berechnet sich die prozentuale Sättigung nach der oben angegebenen Formel einfach zu $100 \cdot \frac{c-b}{c}$ Prozent.

Beispiel: War die Manometerdifferenz bei der Bestimmung von B 19 mm, bei der von C 58 mm, so ergibt sich die prozentuale Sättigung zu $100 \cdot \frac{58-19}{58} = 67{,}2\,\%$.

Bestimmung des Kohlensäuregehaltes des Blutes.

Prinzip: Aus dem durch Ferricyankalium sauerstofffrei gemachten, hämolysierten Blut wird durch Weinsäure die Kohlensäure ausgetrieben.

Erforderliche Reagentien: 1. Ammoniaklösung (s. S. 149); 2. Ferrizyankaliumlösung (s. ebenda); 3. Weinsäurelösung 20%.

Man gibt in die beiden Flaschen je 2 ccm bzw.

0,2 ccm Ammoniaklösung (möglichst CO_2-frei) und schichtet darunter vorsichtig auf der einen Seite 1 bzw. 0,1 defibriniertes Blut (s. oben), in das andere Fläschchen die gleiche Menge + 0,2 ccm bzw. + 0,05 ccm destilliertes, CO_2-frei gemachtes Wasser (das Wasser ist vorher gut auszukochen und in einer mit einem Sicherheitsverschluß von Natronkalk versehenen Flasche aufzubewahren). Das Gefäß mit dem Blut wird gut umgeschüttelt, so daß es lackfarben wird (Krogh empfiehlt Zusatz von wenig Saponin zur Beförderung der Hämolyse); man achtet bei dem Fläschchen des kleinen Apparates darauf, daß die obere Mulde nicht benetzt wird. Man gibt zu dem mit Blut beschickten Fläschchen, nachdem die Hämolyse beendet ist, 0,2 ccm bzw. einen Tropfen Ferrizyankaliumlösung und schüttelt bis zur vollständigen Austreibung des Sauerstoffs. Am großen Apparat setzt man nun die Flaschen nach Fettung der Schliffe an und hängt in das Wasserbad. Die Flaschen sind so zu drehen, daß das Kuppelrohr mit der Flasche nicht in Verbindung steht. Man gibt in das Kuppelrohr der Seite, welche das Blut enthält, 0,2 ccm einer 20%igen Weinsäurelösung, läßt, wenn die Temperatur des Wasserbades angenommen ist und die Manometerstellung sich nicht mehr ändert, die Verbindung des Manometers mit den Flaschen bestehen und durch Drehung der betreffenden Flasche die Weinsäure zum Blut fließen, schüttelt ungefähr 5 Minuten durch, hängt wieder in das Wasserbad, liest die Manometerdifferenz ab und wiederholt dies mit Ausschütteln und Einhängen, bis die Manometerablesung konstant geworden ist.

Bei dem kleinen Apparat wird ganz entsprechend verfahren: Man gibt in die obere Mulde des das Blut enthaltenden Fläschchens nach Austreibung des O_2 0,05 ccm Weinsäure, setzt an und läßt nach konstanter Einstellung des Manometerstandes im Wasserbad die Säurelösung zum Blute fließen. Durchschütteln und weitere Behandlung erfolgt ebenso wie im großen Apparat.

Beim Schütteln mit Weinsäure bilden sich infolge des Koagulationsprozesses leicht Klumpen; es ist daher auf schnelles, ausgiebiges Schütteln zu achten.

Die Berechnung erfolgt, wie für die O_2-Bestimmung angegeben, unter Anwendung der — für das Volumen geltenden — Konstanten und Reduktion auf 760 ccm und 0°.

Bestimmung der Kohlensäure des Blutplasmas.

Bestimmung der Alkalireserve des Blutes nach van Slyke[1]).

Prinzip: Aus dem mit 5,5%iger CO_2 im Gleichgewicht befindlichen Plasma wird die gesamte Kohlensäure durch Schwefelsäure in Freiheit gesetzt; aus dem erhaltenen, am Apparat abgelesenen Volumen wird der Wert auf Grund von Tabellen abgelesen.

Notwendige Lösungen: 1. 1%ige, CO_2-freie Ammoniaklösung: um eine absolut kohlensäurefreie Lösung zu gewinnen, wird die Ammoniaklösung mit Bariumhydrat versetzt, vom ausgefallenen Karbonat abfiltriert und ein eventueller Überschuß an Barium mit Ammonsulfat ausgefällt. 2. Schwefelsäure, 10%ig, 3. Oktylalkohol, sekundär I (Kahlbaum); wenn nicht beschaffbar, gewöhnlicher Caprylalkohol.

Der von van Slyke angegebene Apparat (Abb. 24) ist folgendermaßen konstruiert. Der große Pipettenraum G setzt sich nach obenhin in einen stark verengten Teil und weiterhin in einen fast kapillaren Teil fort. Der Gesamtraum von einer am unteren Teil des Pipettenraumes angebrachten Marke bis zum obersten Ende umfaßt 50 ccm. Von diesen entfällt auf das kapillare Teil 1 ccm, der in 50 Teile zu je 0,02 ccm geteilt ist, so daß 0,01 ccm abgelesen werden kann. Der darunter liegende Teil hat Marken in größeren Abständen, die letzte (2,5 ccm) am Ausgang des Mittelteiles. Das obere Ende des genau geteilten Meßrohres kommuniziert durch einen doppelt durchbohrten Hahn entweder mit einem kapillaren, zur Außenluft führenden Rohr a, oder mit einem Aufsatz b, der ebenfalls seine Verbindung durch ein Kapillarrohr erhält. Der untere Teil des Pipettenraumes kommuni-

[1]) Journ. of biol. Chem. Bd. 30.

ziert durch einen Hahn f entweder mit einem kleineren Vorratsraum d, oder mit einem Rohr c; c und d vereinigen sich an ihrem unteren Ende zu einem Ansatzstück. Von diesem führt ein dickwandiger Schlauch von etwas größerer Länge, als die Höhe des gesamten Apparates beträgt (Druckschlauch), zum Reservoir H.

Der ganze Apparat muß aus starkem Glas angefertigt sein: er wird in einem festen Stativ eingeklammert. Um den Hals von H wird ein starker Draht mit Schlinge befestigt, mit der man dieses Gefäß in verschiedenen Höhen fixieren kann. Die Schliffe müssen tadellos funktionieren, so daß nur eine geringe Spur Fett notwendig ist, um einen absolut luftdichten Verschluß herzustellen. Infolge des starken Druckes durch die Quecksilberfüllung müssen die Hähne durch Gummibänder, oder besser noch durch Spiralen so fixiert sein, daß sie nicht bei einer Druckerhöhung herausgeschleudert werden können.

Abb. 24.

Die Bestimmung der Gesamtkohlensäure des Plasmas hat zur Voraussetzung, daß das Plasma bei der Untersuchung im Gleichgewicht mit dem CO_2-Gehalt der Alveolarluft ist. Schon bei kurzem Aussetzen an Luft dunstet CO_2 ab. Man muß also entweder das Blut unter Paraffin auffangen, was immerhin kompliziert ist, oder — einfacher — das Plasma künstlich mit Kohlensäure sättigen. Man verfährt hierzu folgendermaßen.

Man läßt das Blut direkt aus der Vene in ein graduiertes Zentrifugenglas einlaufen, welches 0,5⁰/₀ der zu entnehmenden Blutmenge an feingepulvertem Kaliumoxalat enthält. Will man also 10 ccm Blut entnehmen, bringt man

vorher in das Zentrifugenglas 0,05 g fein gepulvertes Kaliumoxalat und läßt das Blut direkt aus der Nadel unter leichtem Bewegen des Glases in dieses hereinlaufen. Am Ende schüttelt man einige Male vorsichtig um. Die Vene darf nicht zu sehr gestaut sein. Am besten ist, überhaupt ohne jegliche Stauung zu entnehmen: war eine solche nicht zu umgehen, so ist sie sofort nach dem Einstechen der Nadel zu entfernen. Mindestens eine Stunde vor Entnahme ist stärkere Muskeltätigkeit zu vermeiden.

Das Blut wird in üblicher Weise zentrifugiert, das Plasma abgehoben und kurz vor dem Versuch in folgender Weise

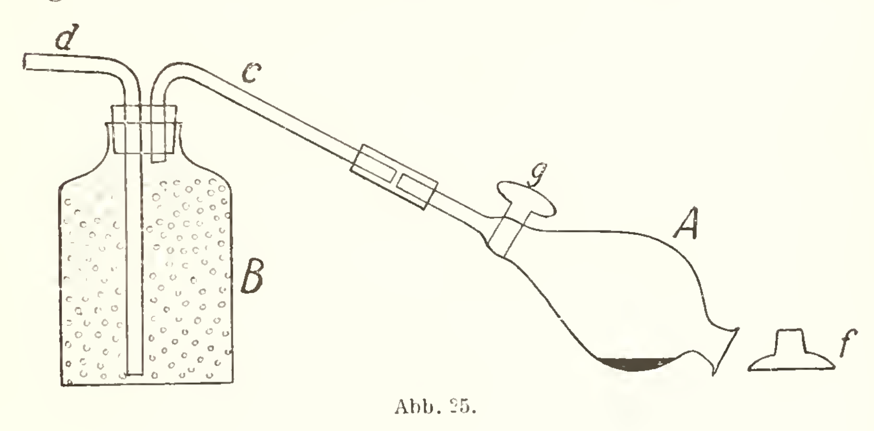


Abb. 25.

mit Kohlensäure gesättigt. Man stellt sich eine kleine Apparatur in Form der Abb. 25 her. In dieser ist A ein Scheidetrichter, der bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung, bei der man ungefähr 3 ccm Plasma verarbeitet, ca. 300 ccm Inhalt hat. Mit seinem unteren Ende durch einen Schlauch verbunden ist eine mit einem Gummistopfen verschlossene Flasche B; durch die eine Bohrung des Stopfens geht das Verbindungsrohr c zum Scheidetrichter, das dicht unter dem Stopfen endet, durch die andere Bohrung das Rohr d, welches bis fast auf den Boden der Flasche reicht. Die Flasche B ist mit Glasperlen gefüllt. Man bringt in den Scheidetrichter ca. 3 ccm Plasma und atmet nun durch das Rohr nach gewöhnlicher Einatmung tief aus. Beim Durchgang durch B schlägt sich die Feuchtigkeit, die sonst Fehler erzeugen könnte,

auf den Glaskugeln nieder: durch c entweicht die kohlensäurehaltige Luft in den Scheidetrichter A und verdrängt dort die darin enthaltene Luft. Unmittelbar nach der Ausatmung setzt man den Stöpsel f auf den Scheidetrichter auf und schließt ihn auch nach der anderen Seite durch den Hahn g ab. Man entfernt ihn vom Schlauche und sättigt durch langsames Drehen des Scheidetrichters das Plasma vollständig mit der CO_2-haltigen Alveolarluft. Man kann statt der Ausatmungsluft auch eine 5,5⁰/₀ige CO_2 enthaltende Luftmischung anwenden, die man aus einer Gasflasche durch den Apparat schickt. Vor Beginn der Versuche muß der Apparat (Abb. 24) mit reinem Quecksilber gefüllt werden, und zwar muß die Menge des Quecksilbers so groß sein, das der ganze Apparat mit der Schlauchverbindung und dem unteren Drittel von H gefüllt ist. Bei neu in Benutzung kommenden Apparaten ist außerdem eine Kalibrierung erforderlich, indem man einen bestimmten Teil des graduierten Rohres mit destilliertem Wasser füllt und nach Herausdrücken des Wassers durch das Kapillarrohr a mit der Wage feststellt, ob das Gewicht dem angegebenen Volumen entspricht. Zur Prüfung auf Dichtheit stellt man den Hahn e so, daß der Apparat mit der äußeren Luft durch b kommuniziert und den Hahn f ebenfalls auf Kommunikation von G mit dem unteren Teil. Man hebt nun H, das man zu ungefähr $^3/_4$ mit Quecksilber gefüllt hat, so weit, daß der ganze Apparat mit Quecksilber gefüllt ist und noch ein geringer Teil über dem Hahn e steht. Dann schließt man durch Drehung von e das graduierte Rohr vollständig von der Außenluft ab und senkt H so tief, wie der Schlauch reicht. Bei Wiedererhebung zum früheren Niveau muß sich die infolge des Senkens von H fallende Quecksilbersäule unter leichtem Anschlagen wieder bis zum Hahn e einstellen.

Zum Beginn jedes Versuches geht man von dem vollständig mit Quecksilber gefüllten Apparat aus, wobei der Hahn e so stehen muß, daß eine Kommunikation des graduierten Rohres mit dem Ansatzstück b hergestellt ist und durch entsprechende Stellung des Niveaugefäßes H das Quecksilber die Kapillare am unteren Ende von b ganz füllt.

Durch Einfüllen von Ammoniaklösung in das Teil b entfernt man aus diesem sämtliche Säurespuren. Man pipettiert das Ammoniak wieder heraus bis auf einen kleinen Rest und unterschichtet dieses mit einer Pipette mit 1 ccm des vorbereiteten Plasmas. Bei gleicher Hahnstellung senkt man das Niveaugefäß H so tief, daß das Plasma in das graduierte Rohr hereingezogen wird. Sobald der letzte Teil des Plasmas den Hahn e passiert hat, ohne daß jedoch Luft angesaugt worden ist wird dieser geschlossen, so daß das Rohr keinerlei Verbindung mehr mit der Außenluft hat. Man gibt dann in b zunächst ca. 0,4 ccm destilliertes Wasser, läßt diese unter Senkung von H durch Öffnung von e zum Plasma fließen, indem man ebenfalls darauf achtet, daß noch etwas Flüssigkeit in b steht, wiederholt diese Manipulation mit weiteren 0,5 ccm destilliertem Wasser, das ungefähr $^1/_4$ Tropfen Oktylalkohol enthält, und gibt endlich unter gleicher Vorsichtsmaßregel 0,5 ccm 10 $^0/_0$ige Schwefelsäure dazu. Die Flüssigkeit muß genau den Raum vom oberen Ende des kalibrierten Rohres bis zur Marke 2,5 einnehmen, widrigenfalls ist etwas Wasser nachzusaugen. Man schließt nun durch Drehung des Hahnes e den graduierten Teil vollständig gegen außen ab und führt nun das Niveaugefäß H ganz tief, wodurch die ganze Flüssigkeit in den Raum G hereingesaugt wird und das Quecksilber nur bis zum Hahn f steht. Man schließt nun auch den Hahn f, so daß die ganze Flüssigkeit in dem Raum zwischen den Hähnen e und f eingeschlossen ist. Durch ungefähr 15maliges Umdrehen des aus dem Stativ herausgenommenen Apparates wird die gesamte Kohlensäure frei gemacht. Man befestigt wieder am Stativ, stellt durch Drehen von f die Kommunikation von G und d her und läßt durch Senken von H die Flüssigkeit aus G nach d fließen, wobei man darauf achten muß, daß kein Gas mit herausgeht; es muß also eine ganz geringe Menge Wasser im untersten Teile von G bleiben. Nunmehr dreht man f so, daß c mit G kommuniziert und hebt H so weit, bis sein Niveau dem sich einstellenden Quecksilberniveau im graduierten Rohr entspricht. Unter diesen Bedingungen ergibt die Ablesung am graduierten

Rohr (bei der selbstverständlich auch der eventuell über dem Quecksilber stehende Wasserrest mitzurechnen ist) die Menge der entwickelten Kohlensäure. Da man, wie oben erwähnt, 3 ccm Plasma mit CO_2 gesättigt hat, hat man genügend Material, um sofort einen Kontrollversuch anzuschließen.

Die Berechnung der CO_2-Kapazität (Alkalireserve) des Plasmas erfolgt nach van Slyke in genügender Annäherung nach der Formel

$$x = \frac{B}{760} \cdot (100{,}8 - 0{,}27\,t)\,(V - 0{,}136 + 0{,}002\,t).$$

In dieser Formel bedeutet x die auf 0^0 und 760 ccm reduzierten ccm CO_2, die 1 ccm Plasma, das bei 20^0 im Gleichgewicht mit Alveolarluft bzw. einer 5,5 $^0/_0$igen CO_2-Lösung ist, als Bicarbonat bindet. B ist der abgelesene Barometerdruck, t die Temperatur (Celsius), V die am Apparat abgelesene CO_2-Menge in ccm.

Um die Rechnung zu vereinfachen, haben van Slyke und Cullen beifolgende Tabelle aufgestellt, aus der man für Temperaturen zwischen 15^0 und 30^0 sofort die „Alkalireserve" für 100 ccm Plasma ablesen kann, wenn man das Produkt $V \cdot \frac{B}{760}$ $\left(\text{Ablesung in ccm.} \frac{\text{Barometerstand zur Zeit des Versuches (mm)}}{760}\right)$ ausgerechnet hat. Für Zwischentemperaturen muß natürlich interpoliert werden (S. 161).

Die aus der Tabelle abgelesenen (korrigierten) Werte liegen unter normalen Verhältnissen zwischen 77 und 53 (bei Kindern zwischen 63 und 46), bei mäßiger Azidose zwischen 40 und 30, bei starker Azidose unter 30.

Anhang.

Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration durch Indikatoren. Nach L. Michaelis[1]).

Diese Methode gehört, strenggenommen, nicht eigentlich in das hier behandelte Gebiet; immerhin mag sie

[1]) Deutsche Mediz. Wochenschr. 1921

$V \cdot \frac{B}{760}$	100 ccm Plasma binden als Bicarbonat ccm CO_2 (0° und 760 ccm)				$V \cdot \frac{B}{760}$	100 ccm Plasma binden als Bicarbonat ccm CO_2 (0° und 760 ccm)			
	15°	20°	25°	30°		15°	20°	25°	30°
0,20	9,1	9,9	10,7	11,8	0,60	47,7	48,1	48,5	48,6
0,21	10,1	10,9	11,7	12,6	0,61	48,7	49,0	49,4	49,5
0,22	11,0	11,8	12,6	13,5	0,62	49,7	50,0	50,4	50,4
0,23	12,0	12,8	13,6	14,3	0,63	50,7	51,0	51,3	51,4
0,24	13,0	13,7	14,5	15,2	0,64	51,6	51,9	52,2	52,3
0,25	13,9	14,7	15,5	16,1	0,65	52,6	52,8	53,2	53,2
0,26	14,9	15,7	16,4	17,0	0,66	53,6	53,8	54,1	54,1
0,27	15,9	16,6	17,4	18,0	0,67	54,5	54,8	55,1	55,1
0,28	16,8	17,6	18,3	18,9	0,68	55,5	55,7	56,0	56,0
0,29	17,8	18,5	19,2	19,8	0,69	56,5	56,7	57,0	56,9
0,30	18,8	19,5	20,2	20,8	0,70	57,4	57,6	57,9	57,9
0,31	19,7	20,4	21,1	21,7	0,71	58,4	58,6	58,9	58,8
0,32	20,7	21,4	22,1	22,6	0,72	59,4	59,5	59,8	59,7
0,33	21,7	22,3	23,0	23,5	0,73	60,3	60,5	60,7	60,6
0,34	22,6	23,3	24,0	24,5	0,74	61,3	61,4	61,7	61,6
0,35	23,6	24,2	24,9	25,4	0,75	62,3	62,4	62,6	62,5
0,36	24,6	25,2	25,8	26,3	0,76	63,2	63,3	63,6	63,4
0,37	25,5	26,2	26,8	27,3	0,77	64,2	64,3	64,5	64,3
0,38	26,5	27,1	27,7	28,2	0,78	65,2	65,3	65,5	65,3
0,39	27,5	28,1	28,7	29,1	0,79	66,1	66,2	66,4	66,2
0,40	28,4	29,0	29,6	30,0	0,80	67,1	67,2	67,3	67,1
0,41	29,4	30,0	30,5	31,0	0,81	68,1	68,1	68,3	68,0
0,42	30,3	30,9	31,5	31,9	0,82	69,0	69,1	69,2	69,0
0,43	31,3	31,9	32,4	32,8	0,83	70,0	70,0	70,2	69,9
0,44	32,3	32,8	33,4	33,8	0,84	71,0	71,0	71,1	70,8
0,45	33,2	33,8	34,3	34,7	0,85	71,9	72,0	72,1	71,8
0,46	34,2	34,7	35,3	35,6	0,86	72,9	72,9	73,0	72,7
0,47	35,2	35,7	36,2	36,5	0,87	73,9	73,9	74,0	73,6
0,48	36,1	36,6	37,2	37,4	0,88	74,8	74,8	74,9	74,5
0,49	37,1	37,6	38,1	38,4	0,89	75,8	75,8	75,8	75,4
0,50	38,1	38,5	39,0	39,3	0,90	76,8	76,7	76,8	76,4
0,51	39,1	39,5	40,0	40,3	0,91	77,8	77,7	77,7	77,3
0,52	40,0	40,4	40,9	41,2	0,92	78,7	78,6	78,7	78,2
0,53	41,0	41,4	41,9	42,1	0,93	79,7	79,6	79,6	79,2
0,54	42,0	42,4	42,8	43,0	0,94	80,7	80,5	80,6	80,1
0,55	42,9	43,3	43,8	43,9	0,95	81,6	81,5	81,5	81,0
0,56	43,9	44,3	44,7	44,9	0,96	82,6	82,5	82,4	82,0
0,57	44,9	45,3	45,7	45,8	0,97	83,6	83,4	83,4	82,9
0,58	45,8	46,2	46,6	46,7	0,98	84,5	84,4	84,3	83,8
0,59	46,8	47,1	47,5	47,6	0,99	85,5	85,3	85,2	84,8
0,60	47,7	48,1	48,5	48,6	1,00	86,5	86,2	86,2	85,7

Von Slyke und Cullen, Journ. of biol. Chem. 30, 316.

als Ergänzung manchem angenehm sein, besonders da sie, obgleich auf strengster theoretischer Basis aufgebaut, ohne Vorkenntnisse schnell und sicher auszuführen ist. Sie ist geeignet für Harn und andere physiologische Flüssigkeiten, auch für Nährflüssigkeiten usw.

Prinzip: Auf Grund elektrometrischer Messung werden mit mehreren Indikatoren, mit einem Umschlag von farblos nach gefärbt, Reihen hergestellt, deren Färbung mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration intensiver wird. Die so hergestellten Färbungen dienen als Testobjekte gegenüber der in der zu untersuchenden Flüssigkeit mit Hilfe des gleichen Indikators hergestellten Färbung. Wird eine schon an sich gefärbte Lösung untersucht, so wird als Vergleichsobjekt die Färbung einer Lösung bekannter Wasserstoffionenkonzentration + Eigenfärbung der untersuchten Flüssigkeit genommen.

Notwendige Reagentien: 1. 0,033 $^0/_0$ige wäßrige Lösung von β-Dinitrophenol; 2. 0,05 $^0/_0$ige wäßrige Lösung von α(1,2,4)-Dinitrophenol; 3. 0,025 $^0/_0$ige wäßrige Lösung von γ-Dinitrophenol; 4. 0,1 $^0/_0$ige wäßrige Lösung von p-Nitrophenol; 5. 0,3 $^0/_0$ige wäßrige Lösung von m-Nitrophenol; 6. $^1/_{10}$ Normal-Natriumkarbonatlösung; 7. Kochsalzlösung 0,85 $^0/_0$ig; 8. Kochsalzlösung, 2 $^0/_0$ig.

Zur Herstellung der Testlösungen werden möglichst gleiche Reagensgläser ausgesucht und mit jedem Indikator 8—9 Mischungen verschiedener Intensität und entsprechend verschiedener Wasserstoffionenkonzentration auf folgende Weise hergestellt. Für Reihe 1 werden 5 ccm der β-Dinitrophenollösung mit der $^1/_{10}$ Normal-Sodalösung auf 50 ccm verdünnt, für die anderen Reihen werden von den Indikatorlösungen 2—5 ebenfalls mit Sodalösung die gleichen Verdünnungen hergestellt. Die Mischung dieser Lösungen mit $^1/_{10}$ Normal-Sodalösung in verschiedenen Verhältnissen ergibt die erforderlichen Wasserstoffionenkonzentrationen. Die Abmessungen sind sehr genau vorzunehmen. Es ergeben sich dann folgende Reihen:

Reihe I			
Nr.	p_H	Verd. β-Dinitrophenollösung	n/10 Sodalösung
1.	2,4	0,49 ccm	6,51 ccm
2.	2,6	0,76 „	6,24 „
3.	2,8	1,15 „	5,85 „
4.	3,0	1,68 „	5,32 „
5.	3,2	2,44 „	4,56 „

	Reihe II			Reihe III		
Nr.	p_H	Verd. α-Dinitrophenollösung	n/10 Sodalösung	p_H	Verd. γ-Dinitrophenollösung	n/10 Sodalösung
1.	2,8	0,51 ccm	6,49 ccm	4,0	0,74 ccm	6,26 ccm
2.	3,0	0,78 „	6,22 „	4,2	1,10 „	5,90 „
3.	3,2	1,20 „	5,80 „	4,4	1,65 „	5,35 „
4.	3,4	1,74 „	5,26 „	4,6	2,40 „	4,60 „
5.	3,6	2,50 „	4,50 „	4,8	3,40 „	3,60 „
6.	3,8	3,40 „	3,60 „	5,0	4,50 „	2,50 „
7.	4,0	4,60 „	2,40 „	5,2	5,50 „	1,50 „
8.	4,2	5,70 „	1,30 „	5,4	6,60 „	0,40 „
9.	4,4	6,70 „	0,30 „			

	Reihe IV			Reihe V		
Nr.	p_H	Verd. p-Nitrophenollösung	n/10 Sodalösung	p_H	Verd. m-Nitrophenollösung	n/10 Sodalösung
1.	5,4	0,16 ccm	6,84 ccm	6,8	0,27 ccm	6,73 ccm
2.	5,6	0,25 „	6,75 „	7,0	0,43 „	6,57 „
3.	5,8	0,40 „	6,60 „	7,2	0,66 „	6,34 „
4.	6,0	0,63 „	6,37 „	7,4	1,0 „	6,0 „
5.	6,2	0,94 „	6,06 „	7,6	1,5 „	5,5 „
6.	6,4	1,4 „	5,6 „	7,8	2,3 „	4,7 „
7.	6,6	2,08 „	4,92 „	8,0	3,0 „	4,0 „
8.	6,8	3,0 „	4,0 „	8,2	4,2 „	2,8 „
9.	7,0	4,05 „	2,95 „	8,4	5,2 „	1,8 „

Die gefüllten Reagensgläser werden etikettiert: auf das Etikett wird die Reihe und die Nummer sowie das p_H notiert. Sie werden mit paraffiniertem Korken luftdicht verschlossen oder zugeschmolzen und halten sich, wenn außer Gebrauch vor Licht geschützt, lange Zeit unverändert.

Zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration einer farblosen Lösung wird folgendermaßen verfahren: Man versetzt in einem Reagensglase gleichen Kalibers wie die Testproben 6 ccm der Flüssigkeit mit 1 ccm der Stammlösungen der verschiedenen Indikatoren. Geben mehrere Indikatoren eine Färbung, so wird für den kolorimetrischen Vergleich der letzte, eine Färbung gebende Indikator verwendet: wird also z. B. mit Indikator 1, 2, 3 eine Färbung hervorgebracht, so dient die Färbung mit 3 zum Vergleich. Man sucht nun einfach aus der mit demselben Indikator hergestellten Reihe das farbähnlichste Teströhrchen heraus. Entspricht eines dieser genau der mit der Versuchslösung erhaltenen Färbung, so kann man von dem Etikett direkt das p_H ablesen: liegt die Färbung zwischen zwei Teströhrchen, so interpoliert man.

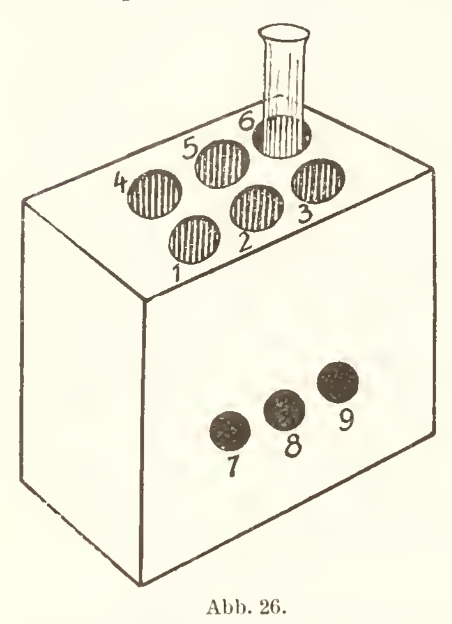


Abb. 26.

Ist die Lösung, deren p_H man feststellen will, schon gefärbt, so wird der Walpolesche Komparator (nach Angabe von Michaelis angewandt. Dieser (Abb. 26) besteht aus einem massiven Holzblock, in den von oben 6 Löcher in 2 genau entsprechenden Reihen hereingebohrt sind, in deren jedes ein Reagensglas bis zu ungefähr zwei Drittel hereingesteckt werden kann. Von vorn nach hinten sind 3 Löcher durchgebohrt, deren jedes zwei hintereinander stehende Löcher durchsetzt. Auf der Rückseite ist eine Mattscheibe angebracht: außerdem kann eine Blauscheibe vor-

gesetzt werden. Will man eine gefärbte Lösung, z. B. Harn, auf ihr p_H untersuchen, so verfährt man folgendermaßen. In ein Reagensglas gleichen Kalibers wie die Teströhrchen bringt man 2 ccm Harn, 4 ccm 2%ige Kochsalzlösung und 1 ccm Indikator. Man steckt dieses Glas in die Bohrung 2 und in die dahinterliegende Bohrung 5 ein gleiches Reagensglas mit Wasser. In die Bohrung 3 bringt man ein Reagensglas mit 2 ccm des gleichen Harnes + 5 ccm 2%ige Kochsalzlösung. In Bohrung 6 steckt man der Reihe nach die mit dem gleichen Indikator hergestellten Testlösungen und beobachtet durch die Sehlöcher 8 und 9, bei Einbringen welchen Röhrchens in Bohrung 6 die Farbtiefe in den beiden Gucklöchern gleich wird. Man hält dazu den Komparator am besten gegen Tageslicht, zunächst mit der Mattscheibe: sehr zweckmäßig ist die von Michaelis empfohlene Hinterschaltung der Blauscheibe, wodurch die Quantitätsunterschiede der Farben in Qualitätsunterschiede verwandelt werden, die man bedeutend genauer ablesen kann. Ist nach Einbringen eines Röhrchens in 6 genau gleiche Farbtiefe erreicht, so gibt das auf diesem Teströhrchen notierte p_H direkt das p_H der untersuchten Lösung an. Unter Umständen muß auch hier interpoliert werden. Für Nährbouillon verfährt man in ganz gleicher Weise, nur daß man als Verdünnung 0,85%ige Kochsalzlösung verwendet.

Sind die Lösungen sehr stark gefärbt oder getrübt, so nimmt man für die Versuchslösung (in Bohrung 2) 1 ccm Harn usw., 5 ccm Kochsalzlösung, 1 ccm Indikator; für die Lösung in Bohrung 3 1 ccm Harn usw. + 6 ccm Kochsalzlösung. Die Ablesung und das sonstige Verfahren bleiben unverändert.

Vereinfachte Methode nach Hämäläinen, Leikola, Airila.

(Skandinav. Archiv für Physiologie 1923, Bd. 43 S. 244.)

Da die nach Michaelis hergestellten Indikatordauerreihen mit den verschiedenen Indikatoren sehr ähnliche Farbtöne geben, haben Verfasser eine einzige Reihe hergestellt, welche zum Vergleich der mit den verschiedenen Indikatoren erzeugten Färbungen dienen kann. Diese

wird folgendermaßen hergestellt: 10 ccm wäßrige 0,05%ige Lösung von α-Dinitrophenol wird (genau wie auch Michaelis angibt) mit n/10 Natriumkarbonatlösung auf 100 ccm verdünnt. Diese (B) dient zur Herstellung der Röhrchen I—IX. Für X und XI wird nur unverdünnte, 0,05%ige α-Dinitrophenollösung (A) benutzt. Der Ansatz der verschiedenen Röhrchen ist der folgende:

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Dinitrophenollösung, verdünnt (B)	0,51	0,78	1,20	1,74	2,50	3,40	4,60	5,70	6,70		
Dinitrophenollösung, unverdünnt (A)										0,77	0,85
n/10 Natriumkarbonatlösung	6,49	6,22	5,80	5,26	4,50	3,60	2,40	1,30	0,30	6,23	6,15

Die Reagensgläser werden entweder mit paraffinierten Korken verschlossen oder noch besser zugeschmolzen.

Zur Bestimmung des p_H verfährt man genau wie vorher bei der Methode von Michaelis angegeben. Die Indikatorlösungen sind die gleichen, auch der Vergleich im Komparator erfolgt genau in gleicher Weise, nur mit dem Unterschied, daß eben die eine Reihe für alle Indikatorgebiete benutzt wird. Je nachdem, welcher Indikator zur Erzielung der Färbung in der zu untersuchenden Lösung benutzt worden ist, ergeben sich bei Farbengleichheit mit einem der Standardröhrchen folgende p_H-Werte.

Nr.	α-Dinitrophenol	γ-Dinitrophenol	p-Nitrophenol	m-Nitrophenol
I	2,8		5,2	6,8
II	3,0		5,4	7,0
III	3,2		5,6	7,2
IV	3,4		5,75	7,35
V	3,6		5,9	7,45
VI	3,8	5,0	6,05	7,6
VII	4,0		6,2	7,7
VIII	4,2		6,35	7,75
IX	4,4		6,5	7,8
X	4,6		6,6	7,9
XI	4,8		6,7	8,0





